

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1936-1937

N° 34

COMPARAISON
DE QUELQUES MÉTHODES DE DOSAGE
DES ACIDES ORGANIQUES URINAIRES

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

présentée et soutenue, le novembre 1937

PAR

Louise CARON-CLAEYSEN

Ancien Interne des Asiles de la Seine
Pharmacien Chef de Laboratoire des Hospices d'Orléans

JURY.....

MM. HÉRISSEY, *Président*

GORIS, *Professeur*

FLEURY, *Maître de Conférences*

SAINT-AMAND (CHER)

IMPRIMERIE R. BUSSIÈRE

26, RUE DE JURANVILLE, 26

1937

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1936-1937

N° 34

COMPARAISON
DE QUELQUES MÉTHODES DE DOSAGE
DES ACIDES ORGANIQUES URINAIRES

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

présentée et soutenue, le novembre 1937

PAR

Louise CARON-CLAEYSEN

Ancien Interne des Asiles de la Seine
Pharmacien Chef de Laboratoire des Hospices d'Orléans

JURY..... { MM. HÉRISSEY, *Président*
 GORIS, *Professeur*
 FLEURY, *Maître de Conférences*

SAINT-AMAND (CHER)

IMPRIMERIE R. BUSSIÈRE

26, RUE DE JURANVILLE, 26

—
1937

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, *Doyen*, O ,  I.
 P. LEBEAU, *Assesseur*, O ,  I. Membre de l'Institut.
 P. DESPORT, *Secrétaire*, ,  I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, O  ,  I	Botanique générale.
LEBEAU O  ,  I, Membre de l'Institut ..	Pharmacie chimique.
GORIS, O  ,  I	Pharmacie galénique.
DAMIENS,  ,  I	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O  ,  I	Chimie biologique.
SOMMELET,  ,  I	Chimie organique.
LUTZ,  ,  I	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE,  ,  I	Toxicologie.
LAUNOY, O  ,  I	Zoologie.
DELABY,  ,  I	Chimie analytique.
PICON,  I	Physique.
MASCRÉ,  I	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O ,  I.

Professeurs honoraires :

MM. BÉHAL, G. O ,  I. et DELÉPINE, O ,  I., membres de l'Institut
 GUERBET, ,  I., PERROT, C. ,  I., COUTIERE, O ,  I.,
 BOUGAULT, O ,  I. et TASSILLY, O ,  I.

MAITRES DE CONFÉRENCES

BACH,  I	Microbiologie.
FLEURY,  I	Hydrologie et Hygiène.
BEDEL,  I	Minéralogie et Législation et Déontologie pharmaceutiques.
RÉGNIER,  I	Parasitologie.
CHARONNAT  I	Chimie et Pharmacie Chimique.
JANOT	Pharmacie galénique et biologie végétale.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. X	Travaux pratiques de 1 ^{re} année	Chimie générale et pharmaceutique.
X	Travaux pratiques de 2 ^e et 3 ^e année.	Chimie analytique
X		Micrographie.
X		Physique.
DEVAL,  ,  I		Microbiologie.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER,  A.



A MONSIEUR LE PROFESSEUR H. HÉRISSEY

Chevalier de la Légion d'Honneur
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

*Qui nous a fait l'honneur de pré-
sider cette thèse, avec l'expression de
notre profond respect.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. GORIS

Chevalier de la Légion d'Honneur
Membre de l'Académie de Médecine
Directeur de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux
et Hospices civils de Paris

*En témoignage de respectueuse
gratitude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ P. FLEURY

Pharmacien en chef des Asiles de la Seine

*Qui nous a inspiré le sujet de
cette thèse et aidé de ses conseils avec
une bienveillance inlassable, en
témoignage de notre profonde recon-
naissance.*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MONSIEUR FRÉDÉRIC COCHINAL

Ancien interne des Hôpitaux de Paris
Pharmacien honoraire des Hospices d'Orléans

*En témoignage de très grande
gratitude et de profond attachement
pour la bienveillance de son accueil
et la sollicitude qu'il nous prodigue
constamment.*

A JEAN

A MON PÈRE

A MA MÈRE

A MON MARI

A MA FAMILLE

A MES AMIS

INTRODUCTION

On entend généralement sous le nom d' « acides organiques urinaires » l'ensemble des radicaux acides organiques existant dans l'urine sans préciser si ces radicaux s'y trouvent salifiés plus ou moins totalement.

Les acides organiques qui ont été caractérisés dans l'urine, le plus souvent en quantité très faible, sont extrêmement nombreux.

C'est ainsi qu'on a signalé : parmi les acides de la série acyclique ; l'acide formique, acétique et leurs homologues supérieurs, propionique, butyrique et isobutyrique, valérique et isovalérique, etc., des diacides, des acides-alcools, des acides-cétoniques, acide oxalique, acide lactique, acide diacétique, acide β oxybutyrique.

Parmi la série cyclique, l'acide hippurique, para-oxyphényl-acétique, uroleucique, para-oxyphényl-propionique, homogentisique, etc.

Dans la série hétérocyclique, l'acide indol-acétique et ses homologues, l'acide urique.

La présence de l'acide citrique longtemps discutée nous semble actuellement démontrée.

La première méthode qui ait tenté de doser en bloc ce groupe si complexe est due à Van Slyke et Palmer [22]. Leur méthode est un dosage acidimétrique de l'urine à l'aide d'un acide fort titré, tel que l'acide chlorhydrique, en présence d'un indicateur coloré, l'orangé IV ou tropéoline 00, lequel vire dans une zone nettement acide à un pH de 2,7, ce qui assure la libération de tous les acides organiques.

Les auteurs se débarrassent au préalable de l'acide phosphorique par une défécation à la chaux.

Plusieurs auteurs ont indiqué des méthodes qui ne sont que des modifications de celle de Van Slyke et Palmer. Nous même, pour l'étude de cette méthode, avons aussi apporté quelques précisions dans le détail de la technique.

Nous avons étudié également l'application au dosage des acides organiques de la méthode de Hehner dont s'était servi antérieurement Seemann pour le dosage des acides organiques contenus dans le suc gastrique. Cette méthode utilise la transformation, sous l'influence de la chaleur, des sels de sodium des acides organiques en carbonate de sodium titrable alcalimétriquement. Enfin partant d'un principe tout à fait différent, Lafargue a donné un procédé de dosage des acides organiques basé sur leur extraction étherée ; ils sont ensuite dosés, assez simplement, par acidimétrie en utilisant le rouge de crésol comme indicateur.

Ces trois méthodes qui utilisent des principes

bien différents ont pu être comparées les unes aux autres, permettant ainsi de préciser leur approximation respective.

Avant d'aborder ces méthodes et de les comparer, la nécessité est apparue tout de suite de mettre au point certaines études portant sur les colorants utilisables, et principalement sur les substances pouvant servir à la défécation préalable de l'urine et spécialement de la chaux qui est le plus souvent employée. Ceci nous a conduit à étudier l'entraînement par la chaux de certains corps jouant un rôle important dans le dosage acidimétrique pratiqué par Van Slyke et Palmer, en particulier, l'acide urique, la créatine et la créatinine.

En possession de ces divers éléments nous avons fait la comparaison de la méthode de Van Slyke et Palmer modifiée par nous avec celle de Hehner que nous avons mise au point pour le dosage des acides organiques urinaires et qui est plus spécifique ; ensuite nous avons comparé la méthode de Lafargue avec celle de Hehner.

Notre travail se trouve donc divisé de la façon suivante :

PREMIÈRE PARTIE. — *Etude critique de la méthode de Van Slyke et Palmer :*

— Exposé théorique.

— Mise en pratique de la méthode et modifications que de nombreux auteurs et nous-même lui avons fait subir.

— Étude de quelques indicateurs colorés utilisables pour ce dosage : bleu de bromo-phénol, bleu de para-xylénol.

— Étude de quelques modes de défécation de l'urine, emploi de la baryte, de la magnésie, de la chaux ; ce qui conduit à supprimer l'emploi d'un déféquant.

— Influence de la défécation basique de l'urine sur l'acide urique, la créatinine et la créatine.

Ces diverses études, qui nous ont fait mieux connaître les différents temps de la méthode de Van Slyke et Palmer et dans quel sens la défécation à la chaux modifiait les résultats, nous permettent de faire la comparaison dans une seconde partie avec la méthode de Hehner.

SECONDE PARTIE. — *Etude de la méthode de Hehner.*

— Exposé technique de la méthode.

— Exposé théorique des principes sur lesquels elle est basée et raisons de certains détails techniques dus aux rôles de l'ammoniaque, des phosphates et des sels alcalino-terreux.

— Comparaison des résultats de la méthode avec ceux de la méthode colorimétrique.

TROISIÈME PARTIE. — *Etude de la méthode de Lafargue.*

— Description de cette méthode.

— Modifications que nous lui avons apportées.

— Comparaison des méthodes de Hehner et de Lafargue.

CONCLUSION DE L'ENSEMBLE DE CE TRAVAIL

Avant d'entrer dans le détail de l'exposé de notre travail nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à M. le Professeur Hérissé pour la bienveillance avec laquelle il a accueilli notre travail. Nous remercions aussi M. le Professeur Goris d'avoir bien voulu accepter de faire partie du jury de notre thèse et de nous avoir autorisé à y travailler dans les laboratoires de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux quand nous y étions chimiste. Nos remerciements s'adressent tout particulièrement à M. le Professeur agrégé P. Fleury pour les encouragements précieux qu'ils nous a prodigués et la longue et constante bienveillance dont il a fait preuve à notre égard.

Que M. Poirot trouve ici l'expression de notre gratitude pour l'intérêt qu'il nous a témoigné en diverses circonstances.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE CRITIQUE DE LA MÉTHODE DE VAN SLYKE ET PALMER

CHAPITRE I

MÉTHODE DE VAN SLYKE ET PALMER THÉORIE DE LA MÉTHODE

La méthode de Van Slyke et Palmer [22] est basée sur les faits théoriques suivants :

1) Pour changer la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse de 10^{-8} à 2×10^{-3} il faut relativement très peu d'un acide minéral fort si les électrolytes ne sont constitués que par des sels alcalins d'acides forts, tels que les sulfates et les chlorures.

2) S'il y a un sel d'acide faible avec une base forte, l'addition de près d'une molécule d'un acide fort

comme l'acide chlorhydrique pour chaque molécule d'un tel sel est nécessaire pour changer la concentration en ion H. Les acides organiques connus, se trouvant dans les urines normales ou pathologiques, appartiennent à la classe des acides faibles qui se comportent comme nous l'avons dit ci-dessus.

3) Les seuls acides minéraux trouvés dans l'urine qui appartiennent à la série des acides faibles et par conséquent dont les sels se comportent de la même façon sont l'acide phosphorique et l'acide carbonique. De ces deux acides, le plus abondant de beaucoup est l'acide phosphorique. L'acide carbonique, dans le cas le plus fréquent où le pH est au-dessous de 6,5 (voir Ch.-O. Guillaumin [12]), est pratiquement négligeable. Quoiqu'il en soit, ces deux acides sont éliminés par une défécation à la chaux.

4) Les bases faibles forment, avec des acides forts, des sels qui se conduisent comme ceux des acides faibles avec les bases fortes. La créatinine est ainsi titrée presque totalement pendant le changement de la concentration en ion H de 10^{-8} à 2×10^{-3} et la créatine environ pour environ 60 p. 100.

L'ammoniaque intervient également dans le dosage, 7/100 en sont dosés et les acides aminés le sont en totalité.

Donc, dans une solution à pH 8,2, c'est-à-dire, au virage rose de la phtaléine du phénol, les acides organiques peuvent être considérés comme entièrement transformés en sels neutres ; si à cette solution on ajoute peu à peu un acide fort tel que l'acide

chlorhydrique, on déplace les acides organiques et le pH du milieu décroît jusqu'à s'approcher de 1. A partir de pH 2,7 les acides organiques sont entièrement libérés. La quantité d'acide ClH employé est évidemment proportionnelle à celle des acides organiques existants.

La détermination de ce pH 2,7 est obtenue grâce à un indicateur coloré ; le plus fréquemment employé est l'orangé IV qui vire de pH 1,3 à pH 3,2 (d'après Kolthoff) ; son maximum d'intensité n'est donc pas atteint au pH 2,7 et sa coloration augmentera encore si on dépasse cette zone, ce qui permettra de reconnaître qu'on a été trop loin et au besoin de revenir en arrière.

Technique de la méthode de Van Slyke et Palmer

- RÉACTIFS. — *a*) chaux éteinte non carbonatée,
b) solution alcoolique de phtaléine à 1 p. 100,
c) acide chlorhydrique 0,2 normal,
d) solution alcoolique d'orangé IV à 0,02 p. 100.

TECHNIQUE

On introduit dans une fiole de 250 centimètres cubes :

- 100 centimètres cubes d'urine environ,
- 2 grammes de chaux éteinte.

On laisse 15 minutes en contact, en agitant ; on filtre sur un filtre plissé.

Les carbonates et les phosphates sont éliminés.

A 25 centimètres cubes du filtrat, placé dans des tubes de verre de 30 millimètres de diamètre intérieur et de 20 centimètres de long ayant de 125 à 150 centimètres cubes de capacité, on ajoute :

a) 0,5 cm³ de solution de phtaléine du phénol à 1 p. 100 ;

b) de l'acide ClH 0,2 N jusqu'à virage rose pâle (pH : 8 environ) ;

c) 5 centimètres cubes de tropéoline 00 à 0,02 p. 100 ;

Il faut avoir soin d'agiter en versant le colorant, sans cela, une partie de celui-ci pourrait être précipitée ; finalement on ajoute :

d) de l'acide ClH 0,2 N (N/5) jusqu'à ce que la couleur soit comparable à un étalon contenant : 0,6 cm³ de ClH 0,2 N, 5 centimètres cubes de tropéoline 00 et de l'eau jusqu'à un volume de 60 centimètres cubes ; quand on est à la fin du virage on ajoute suffisamment d'eau pour arriver au volume de 60 centimètres cubes égal à celui du témoin. On opère dans un tube semblable. Quelquefois il est nécessaire aussi d'employer une technique semblable pour apprécier la neutralisation en présence de la phtaléine, dans ce cas un tube d'urine filtrée, non additionnée de phtaléine sert de témoin. Du nombre de centimètres cubes d'acide ClH utilisés entre le virage de la phtaléine et celui de la tropéoline 00 on soustrait ce qui a été nécessaire à l'obtention du témoin, en général 0,6 cm³.

Il est difficile d'exprimer la quantité d'acides or-

ganiques en fonction de l'un d'eux puisque leur nombre est très grand et leurs proportions variables, il est donc préférable d'exprimer le résultat en centimètres cubes d'une solution acide décijnormale (1). Pour calculer ce résultat, le nombre n représentant l'acide ClH 0,2 utilisé est multiplié par $\frac{1000}{25} = 40$ de façon à transformer le résultat obtenu avec 25 centimètres cubes en un résultat par litre puis multiplié par 2 pour changer N/5 en N/10 ; soit multiplier le nombre de centimètres cubes d'ClH 0,2 N utilisé par 80.

Modifications apportées à cette première méthode

Cette méthode a été reprise par différents auteurs, par Goiffon et Nepveu [8] qui utilisent de l'acide chlorhydrique décijnormal ; Guillaumin [11] l'a perfectionnée en utilisant un comparateur ; Mainzer et Joffe [16] l'appliquent à la microanalyse sans modification de principe mais ils emploient un autre indicateur qui est le sel de potassium de l'acide benzyl-aniline - para-benzol-sulfonique. Greenwald utilise pour la défécation de l'urine le réactif de Lloyd, sorte de terre à foulon qui enlève plusieurs substances qu'entraîne aussi l'acide phospho-tungstique (Nous n'avons pas pu nous procurer de réactif de Lloyd).

(1) Ceci peut être rapproché de ce que Chatron [1], à l'exemple de l'école américaine appelle les milliéquivalents ; ce sont des di-milliéquivalents.

Nous avons repris à notre tour la méthode, à laquelle nous avons aussi fait subir quelques modifications.

MODIFICATIONS DU TÉMOIN. — Le témoin a été légèrement changé : nous l'avons préparé de la façon suivante : à 60 centimètres cubes d'eau nous ajoutons 6 centimètres cubes de solution d'orangé IV, soit $\frac{1}{10}$ du volume de l'eau, et 1,2 cm³ de ClH décimormal. Le colorant est employé à une dose plus élevée, ceci surtout pour que les proportions de colorant et le volume final au moment du virage soient dans un rapport plus simple, permettant de continuer le dosage dans le cas où l'on viendrait à dépasser le volume final prévu par suite d'une teneur en acides organiques très élevée. Il suffirait alors d'ajouter une nouvelle quantité de colorant et de diluer jusqu'à un nouveau volume proportionnel à cette quantité de l'indicateur. Dans ces conditions le témoin préparé d'avance peut continuer à être utilisé.

EMPLOI D'UN COMPARATEUR. — La fin du virage est quelquefois difficile à percevoir et l'emploi d'un comparateur, suivant la méthode ordinaire est presque indispensable.

TECHNIQUE. — Pratiquement voici comment nous opérons :

Nous partons de 100 centimètres cubes environ

d'urine auxquels nous ajoutons à peu près 2 grammes de chaux éteinte non carbonatée ; on agite et après un quart d'heure de contact on filtre ; on a ainsi un liquide, qui, neutralisé en présence de phtaléine par de l'acide ClH normal puis décinormal (ceci, pour ne pas amener de trop grandes dilutions) va servir au dosage. Pour cela on part de 25 centimètres cubes de liqueur filtrée que l'on place dans une éprouvette de 125 centimètres cubes graduée et fermant à l'émeri, ce qui facilite l'agitation, par simple retournement, à chaque nouvelle addition d'acide. A ces 25 centimètres cubes d'urine neutralisée jusqu'à la teinte rose pâle de la phtaléine comme il est indiqué ci-dessus, on ajoute 6 centimètres cubes de la solution de colorant et l'acide chlorhydrique décinormal est versé avec une burette graduée en $1/10$ de centimètre cube jusqu'à coloration rouge orangée en complétant au fur et à mesure avec de l'eau distillée jusqu'à un volume voisin de $67,2 \text{ cm}^3$ ($66 \text{ centimètres cubes} + 1,2$ pour ClH contenu dans le témoin) ; quand on approche du virage final on verse la liqueur, après chaque addition d'acide, dans le tube du comparateur et on la remet dans l'éprouvette si l'intensité désirée n'est pas encore obtenue. Nous arrivons ainsi à apprécier l'addition de deux gouttes de ClH décinormal quand le virage se fait dans des conditions favorables.

Il y a intérêt à faire le dosage assez rapidement et nous verrons que souvent à la suite d'une première détermination trop indécise pour des causes sur

lesquelles nous reviendrons plus loin, on est amené à en faire une seconde. Dans ce cas si le premier essai nous a indiqué qu'il fallait N centimètres cubes d'acide décinormal on verse rapidement ($N-0,5$ cm³) d'acide et on finit la détermination au comparateur plus lentement.

Du nombre de centimètres cubes d'acide décinormal qu'il a fallu pour obtenir le virage, on soustrait 1,2, étant donné qu'il a fallu 1,2 cm³ de ClH décinormal pour établir le témoin.

Goiffon [8] rapporte les résultats à 1.000 centimètres cubes mais pour faire une étude comparée des méthodes employées il nous a paru inutile de faire ce calcul et tous les chiffres donnés, à moins d'indications spéciales, se rapporteront au dosage fait sur 25 centimètres cubes dans les conditions énoncées ci-dessus.

CHAPITRE II

ÉTUDE DE QUELQUES INDICATEURS COLORÉS

L'emploi de l'orangé IV comme indicateur peut occasionner dans certains cas des difficultés : en effet il y a des urines qui, probablement par réduction, décolorent complètement ce colorant. Au moment où l'on entre dans la zone de virage le colorant semble disparaître totalement, puis après un certain temps, quelques heures, il reparaît ; l'addition d'eau oxygénée au liquide décoloré provoque le plus souvent sa recoloration. Cette décoloration de l'orangé IV a été signalée pour certaines urines de tuberculeux. Elle se produit aussi après l'absorption de certains médicaments. D'ailleurs, d'une façon générale il y a un léger affaiblissement de coloration au moment du virage final (1) ; c'est pourquoi nous avons souvent fait suivre le premier dosage d'un second où la quantité d'acide est ajoutée d'un seul coup à quelques dixièmes de centimètres cubes près. Dans ces dosages nous avons trouvé un chiffre légèrement infé-

(1) Ce que PALMER appelle le « Fading » [18].

rieur au premier, car le fléchissement d'intensité du colorant provoque une hésitation et l'addition de quelques gouttes supplémentaires d'acide pour s'assurer de la fin du virage.

Un autre inconvénient est dû à la facilité avec laquelle l'orangé IV est précipité par les sels de magnésium (pour lesquels il est utilisé comme réactif) et aussi par les sels de calcium.

Il y avait donc intérêt à chercher si on pouvait employer d'autres colorants virant dans la même zone de pH que l'orangé IV. Nous avons essayé :

le β -dinitro-phénol,
le bleu de bromo-phénol,
le bleu de para-xylénol.

1) β Dinitro-phénol.

Les essais avec le β -dinitro-phénol ont été infructueux, le virage est difficile à voir, le passage du jaune à pH 4 à l'incolore à pH 2,4 se faisant très lentement, et pratiquement, il reste toujours une légère coloration jaune.

2) Bleu de bromo-phénol

Le bleu de bromo-phénol (tétra-bromo-phénol-sulfone-phtaléine) vire au jaune à pH 2,8, au bleu à pH 4,6 ; il a été proposé par Palmer [18] pour remplacer l'orangé IV dans le cas de « *fading* ». La solution a été préparée de la façon suivante : 0,10 g.

sont dissous dans 3 centimètres cubes de soude décinormale, on complète à 250 centimètres cubes avec de l'eau. Les premiers essais ont été faits avec un témoin de pH 2,7 dont voici la composition :

Acide citrique...	0,1 mol. (21 g. p. 1.000)	87 cm ³
PO ⁴ Na ² H 12H ² O.	0,2 mol. (71,6 g. p. 1.000)	13 cm ³

En nous plaçant dans les conditions de volume et de dilution qui ont été indiquées à propos de l'emploi de l'orangé IV et du dosage des acides organiques dans l'urine, nous avons obtenu des chiffres très voisins de ceux trouvés avec l'orangé IV comme indicateur, mais le virage est difficile à lire car à pH 2,7 le colorant est presque sorti de sa zone de virage. Nous avons essayé de prendre comme terme pH 3, que l'on obtient avec la solution suivante :

Acide citrique	0,1 mol.	79,5 cm ³
PO ⁴ Na ² H 12H ² O	0,2 mol.	20,5 cm ³

Les chiffres trouvés alors sont toujours inférieurs à ceux obtenus avec l'orangé IV ce qui s'explique facilement.

VALEUR DE LA CORRECTION. — Dans chaque dosage colorimétrique on est amené à ajouter quelques centimètres cubes ou dixièmes de centimètres cubes d'acide en trop, ce chiffre varie en fonction du volume total du liquide, de la sensibilité de l'indicateur coloré et du terme acidimétrique que l'on s'est imposé ; nous avons vu que Van Slyke et Palmer, dans les conditions de leur dosage avaient fixé cette valeur

comme étant égale à 1,2 cm³ d'acide ClH décinormal ; ici ce chiffre sera forcément différent. Nous avons tenté de déterminer sa valeur en supposant qu'elle soit constante. Si nous prenons une solution d'un acide organique connu et que nous en introduisons dans notre dosage des volumes multiples simples les uns des autres, 10, 20, 30 centimètres cubes, etc., les résultats doivent être entre eux dans le rapport de 1, 2, 3, etc. Les chiffres trouvés ont été les suivants 2,5-4,7-6,7-8,9, nous voyons que si nous retranchons la quantité fixe 0,4 nous avons : 2,1-4,3-6,3-8,5 qui sont sensiblement proportionnels aux quantités mises en œuvre. Le chiffre 0,4 représente donc la constante à soustraire du résultat brut.

Des essais ont été faits sur des solutions connues puis sur des urines, comparativement avec l'orangé IV.

Voici quelques exemples de dosages avec le bleu de bromo-phénol, le témoin étant à pH 3, correction faite des 0,4 cm³ qu'il faut retrancher et les mêmes dosages faits en employant l'orangé IV, correction faite de 1,2 cm³ (résultats en centimètres cubes de solution acide décinormale rapportés à 25 centimètres cubes d'urine) : voir le tableau de la page 19.

Le taux de l'erreur n'est donc pas constant puisqu'il oscille de 4,7 à 25 p. 100 avec une moyenne de 13 p. 100 ; cependant si on était amené à utiliser le bleu de bromo-phénol, on pourrait ajouter en moyenne 13 p. 100 ce qui ne donnerait pas, à quelques exceptions près une très grosse erreur.

Bleu de bromo-phénol	Orangé IV	Déficit % par rapport à l'orangé IV
2,1	2,8	25
4,3	5,6	23,2
6,3	8,4	25
6,3	7,3	16
12,8	14,3	10,5
6,4	7,6	18,75
4,7	5,8	18,9
7	8	14,3
8,4	9,1	8
11,75	14,6	24
13,6	16,4	17
10,6	12,3	25
9	11,25	25
8,3	9,3	12
6,2	6,8	11
6	6,6	12,5
8,15	9,1	12,5
7,4	8,4	13
12,4	13,8	11,2
12,3	13,3	7,7
8,5	9,5	10,5
6,5	6,9	5,7
10	10,5	4,7

3) Emploi du bleu de para-xylénol.

(1-4 di-méthyl 5-oxy-benzol-sulfone-phtaléine).

La solution doit être assez concentrée pour que le virage soit net ; 0,60 p. 1.000 en solution dans l'alcool à 50° ; nous avons utilisé 6 centimètres cubes de colorant pour 60 centimètres cubes de liqueur mise en œuvre. Dans l'emploi de ce colorant, comme ci-dessus pour l'utilisation du bleu de bromo-phénol il faut respecter soigneusement les rapports de dilu-

tion dans la liqueur et dans le tube placé derrière le témoin dans le comparateur.

Le virage comprend 2 zones : il vire d'abord du rouge au jaune entre pH 1,2 et pH 2,8 et du jaune au bleu entre pH 8 et pH 9,6. Dans les conditions de nos expériences il est sensible à 0,1 à 0,2 cm^3 . Les expériences pour déterminer la constante à soustraire des chiffres bruts donnés par le dosage ont été faites comme nous l'avons indiqué plus haut au sujet du bleu de bromo-phénol, elles nous ont conduit au chiffre de 0,50 cm^3 . Nous avons pris comme témoin la solution déjà mentionnée correspondant au pH 2,7; la comparaison des chiffres obtenus pour établir cette constante montre que, à quelques petits écarts près, dans une représentation graphique ils viennent se placer sur une droite.

COMPARAISON DES RÉSULTATS SUIVANT L'EMPLOI DU BLEU DE PARA-XYLÉNOL ET DE L'ORANGÉ IV (rapportés à 25 centimètres cubes d'urine, en centimètres cubes de solution acide décinormale) : voir le tableau de la page 21.

En conclusion nous pouvons donc dire que l'orangé IV qui n'est pas un indicateur utilisable en présence de certains sels alcalino-terreux ni avec les urines contenant des substances réductrices, peut être remplacé éventuellement par le bleu de bromo-phénol avec les restrictions que nous avons faites ci-dessus ou préférablement par le bleu de para-xylénol. Les résultats obtenus dans ce cas sont si

proches de ceux donnés par l'emploi de l'orangé IV qu'on peut considérer le bleu de para-xylénol comme pouvant lui être substitué sans aucun inconvénient et même avec avantage.

Bleu de para-xylénol	Orangé IV
22,2	21,4
17,7	17,7
27,8	décoloration totale
23,8	23,5
13	12,8
11,5	11,8
14,5	14,0
20,0	19,8
17,0	17,0
12,0	11,9
22,1	22,0
15,2	15,3
15,65	15,65
12,6	12,5
16,8	16,9
10,3	10,3
18,0	18,0
10,9	10,8
13,8	13,5

CHAPITRE III

DE QUELQUES MODES DE DÉFÉCATION
DE L'URINE

PAR LA BARYTE
LA MAGNÉSIE
LA CHAUX

I. — Emploi de la baryte.

La chaux a pour but, principalement, de débar-
rasser les urines des phosphates et éventuellement
des carbonates. Mais il n'est pas démontré que cet
agent n'entraîne pas d'autres corps, aussi nous a-t-il
semblé intéressant de comparer les résultats avec
ceux obtenus en utilisant divers autres déféquants
susceptibles de remplir le même rôle que la chaux.
Nous avons d'abord essayé la baryte.

a) TECHNIQUE. — Nous avons procédé comme il
est indiqué dans la méthode de Sørensen-Mestrezat
pour doser les acides aminés. On prend :

Urine.....	50 cm ³
Solution de phtaléine à 1 p. 100 ...	II gouttes

à laquelle on ajoute

BaCl ² crist	2 g.
Eau de Baryte q. s. p. amener à coloration rose	

puis

Eau de baryte	5 cm ³
Eau distillée q. s. p.	100 cm ³

On a ainsi de l'urine diluée au demi, il faudra en prendre 50 centimètres cubes pour faire des dosages comparables aux précédents.

Mais ici se présente une difficulté : la solution d'orangé IV précipite complètement en présence des sels de baryum et le dosage devient absolument impossible. Il faut éliminer l'excès de sels de baryum ; afin de ne pas arriver à de trop grandes dilutions on ajoutera du sulfate de sodium à l'état cristallisé plutôt qu'en solution. Mais une autre cause d'erreur se manifeste alors, c'est le changement apporté au dosage par la présence d'une grande quantité de sulfate de sodium. Nous verrons un peu plus loin que la présence du sulfate de sodium dans la solution n'est pas négligeable et détermine une légère augmentation des résultats, c'est pourquoi il faut ajouter le sulfate de sodium petit à petit jusqu'à cessation de précipité en évitant soigneusement tout excès.

Le dosage est pratiqué ensuite sur 50 centimètres cubes du liquide ainsi deux fois déféqué (on ne tient pas compte du changement de volume apporté par l'addition de $\text{SO}^4 \text{Na}^2 10 \text{H}^2\text{O}$) et continué comme

il a été indiqué à propos de la méthode de Van Slyke et Palmer.

b) COMPARAISON ENTRE LES RÉSULTATS TROUVÉS SUR DES URINES NON DÉFÉQUÉES ET TRAITÉES A LA CHAUX ET A LA BARYTE.

Traitement à la chaux	A la baryte
9,9	9,1
10,8	8,1
9,5	7,5
11,7	9,5
11,7	10,6
7,5	5,7
5,8	4,2
13,7	9,4
5,5	4,2

Ces premiers dosages montrent que les résultats obtenus avec la baryte sont constamment inférieurs à ceux donnés par la chaux; il semble donc légitime d'admettre que la baryte entraîne quelque chose de plus que la chaux. L'erreur causée par un excès de sulfate de soude se manifestant par une augmentation de la valeur des chiffres obtenus, cette erreur ne peut donc intervenir que pour masquer la différence observée et non pas pour la créer.

c) INFLUENCE DE L'ACIDE SULFURIQUE ET DU SULFATE DE SODIUM DANS UN DOSAGE ACIDIMÉTRIQUE AMENÉ A pH 2,7.

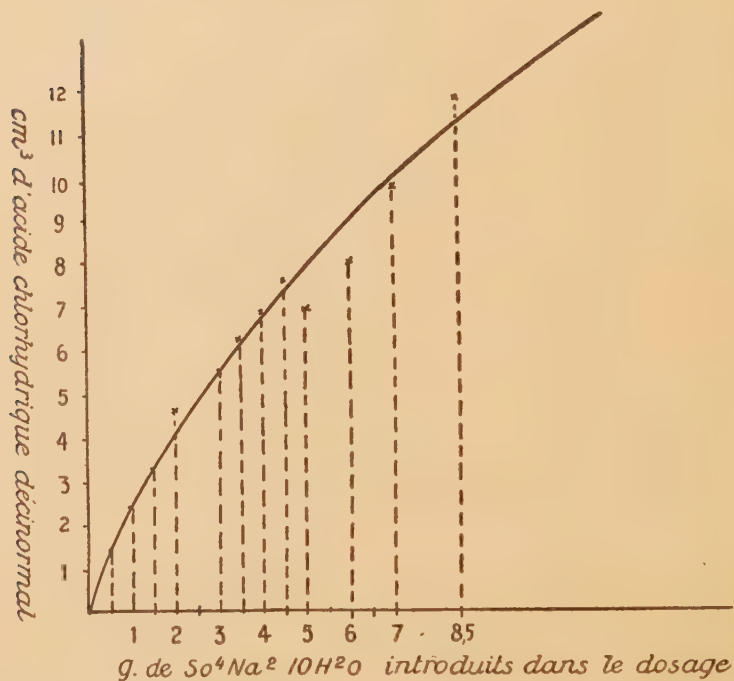
Nous avons indiqué à propos des essais de défé-

cation à la baryte que l'addition de sulfate de sodium en excès amenait des changements dans les résultats bien qu'on doive le considérer comme un sel neutre.

En effet, nous avons essayé de doser des solutions de sulfate de sodium par la méthode Van Slyke et Palmer ; nous prenons une quantité déterminée de sulfate de sodium cristallisé que nous dissolvons dans 20 centimètres cubes d'eau ; nous y versons 6 centimètres cubes d'orangé IV et nous faisons tomber de l'acide ClH décínormal jusqu'au virage correspondant au pH 2,7, dans les conditions habituelles de volume. Nous constatons que le virage n'est pas instantané et que la présence du sulfate de sodium entraîne la consommation d'une certaine quantité de ClH décínormal. Partant de quantités croissantes de sulfate de sodium que nous dosons acidimétriquement nous arrivons aux résultats suivants :

Quantité de $SO_4Na^2 10H_2O$ en g.	cm ³ d'acide ClH décínormal
0,50 g.	1,5 à 1,6
1	2,4 à 2,6
1,50	3,3 à 3,6
2	4,8
3	5,6
3,5	6,3 à 6,6
4	7
4,5	7,8 à 8
5	7
6	8,8
7	9,8
8,5	12,1

Ces chiffres ont pu être inscrits sur une courbe qui nous montre que les petites additions de sulfate ont relativement un effet plus considérable que des quantités plus importantes.



Il ressort donc en conclusion des essais ci-dessus que la présence de sulfate de sodium n'est pas indifférente dans un dosage acidimétrique qui va jusqu'au terme du pH 2.7 et qu'elle en augmente légèrement la valeur.

II. — Défécation à la magnésie : Méthode de Philibert

Nous avons fait l'essai d'une seconde base pour déféquer l'urine, c'est la magnésie. Nous l'avons utilisée suivant les indications données par la méthode de Philibert [20]. Celui-ci utilise la magnésie dans le but de débarrasser une liqueur de l'ammoniaque qu'elle contient en l'entraînant sous la forme d'un précipité de phosphate-ammoniac-magnésien ; il introduit à la fois la magnésie et les phosphates nécessaires.

Mais si la liqueur contient primitivement des phosphates, ceux-ci seront entraînés ainsi que l'ammoniaque à l'état de phosphate ammoniac-magnésien et c'est à ce point de vue que la méthode de Philibert nous intéresse. La magnésie aura joué le même rôle que la chaux, du moins nous le supposons, sauf peut-être en ce qui concerne les carbonates, mais ceux-ci peuvent être négligés comme nous l'avons déjà fait remarquer (voir p. 8) dès que le pH de l'urine est au-dessous de 6,5, ce qui est le cas ordinaire.

a) TECHNIQUE. — Voici comment opère Philibert :

Réactifs : 1^o réactif calcique :

{ Phosphate monocalcique	100 g.
{ PO^4H^3 off.	10 cm ³
{ Eau distillée q. s. p.	1.000 cm ³

La solution se fait mieux à froid.

2^o magnésie hydratée.

La magnésie hydratée a été préparée récemment avec de la magnésie calcinée mise dans l'eau et portée à ébullition, puis conservée en flacon bien bouché selon la méthode du Codex.

Technique. — Mettre dans un mortier de verre :

Urine	40 cm ³
Réactif calcique	11 cm ³
Phtaléine du phénol sol. à 1 %	V à VI gouttes
Magnésie hydratée q. s. p. obtenir le virage au rose de la phtaléine	2 à 3 grammes

La magnésie est ajoutée peu à peu tout en triturant avec un pilon jusqu'au moment où la liqueur commence à devenir rose et on filtre immédiatement ; si on attend, la coloration rose augmente d'intensité très rapidement et il faut recommencer (1).

b) DIFFICULTÉS DANS L'EMPLOI DE L'ORANGÉ IV.
ESSAI POUR Y REMÉDIER.

Quand on a obtenu une liqueur ainsi débarrassée des phosphates et de l'ammoniaque, il faut procéder au dosage acidimétrique, mais ici on se heurte à une difficulté sérieuse : la liqueur précipite l'orangé IV qui est précisément un réactif des sels de magnésium. Nous avons essayé de prendre l'orangé IV

(1) La quantité d'ammoniaque résiduelle, en général très faible (18 à 36 milligrammes) augmente avec l'alcalinité (Philibert [19]) ; ce point important quand on veut éliminer l'ammoniaque semble avoir une importance moindre pour nous.

lui-même pour éliminer l'excès des sels de magnésium. Voici un résumé de ces essais :

Réactifs : 1^o solution concentrée d'orangé IV : 0,40 g. dans 100 centimètres cubes d'alcool ($1 \text{ cm}^3 = 0,004 \text{ g.}$).

2^o solution saturée de magnésie.

On peut en effet assimiler l'urine après défécation par le procédé de Philibert à une solution saturée de magnésie quant à son comportement vis-à-vis de la solution d'orangé IV. Nous prenons donc une solution saturée de magnésie et nous y versons l'orangé IV progressivement, à chaque fois il y a une précipitation, nous centrifugeons ; après plusieurs opérations identiques nous obtenons un liquide pratiquement débarrassé de la plus grande quantité de la magnésie qu'il contenait. Il faut alors apprécier la quantité de colorant restant pour connaître approximativement la quantité qui a été nécessaire pour précipiter la magnésie, et pour ramener le colorant à une concentration identique à celle du témoin de la méthode colorimétrique permettant de procéder au dosage acidimétrique qui doit suivre.

Nous répétons ensuite les mêmes opérations sur une urine traitée par la magnésie ; on détermine sur 10 centimètres cubes la quantité de colorant nécessaire à la précipitation de la magnésie restante (il en a fallu 4 centimètres cubes), puis on répète la même opération sur 20 centimètres cubes en y versant peu à peu le volume de colorant qui a été trouvé utile. On pratique alors un dosage acidimé-

trique ordinaire ; il reste en fait un léger louche, mais il ne gêne pas la lecture. Cette méthode permet de comparer les résultats obtenus par traitement à la chaux et ceux obtenus après traitement à la magnésie en employant dans les deux cas l'orangé IV comme indicateur. Cependant, étant donnée la difficulté de ces manipulations, il était plus simple d'employer un autre colorant, le bleu de bromo-phénol par exemple. (Nous avons vu que les écarts des résultats comparés à ceux obtenus avec l'orangé IV n'étaient pas constants, mais cela n'a plus d'importance quand il s'agit de comparer l'action de la chaux ou de la magnésie sur un même échantillon).

Pour les calculs, on tiendra compte de la dilution subie par l'urine pendant la défécation à la magnésie ce qui revient à multiplier les chiffres trouvés par $5/4$ (1).

c) COMPARAISON ENTRE L'EMPLOI DE LA CHAUX ET DE LA MAGNÉSIE.

Voici les résultats permettant de comparer l'influence de la défécation avec la chaux et la magnésie. Ceux-ci se rapportent à 20 centimètres cubes

(1) La formation du précipité cristallin de phosphate ammoniacomagnésien à 12 mol. d'eau de cristallisation, ainsi que la persistance possible dans l'essai des phosphates bicalciques et bimagnésiens à 2 et 7 mol. d'eau de cristallisation, entraîne à chaque essai une quantité d'eau variable et concentre ainsi légèrement les liqueurs. Pour éviter cette correction Philibert [19] ajoute aux 40 centimètres cubes d'urine en action, 11 centimètres cubes de réactif calcique au lieu de 10 centimètres cubes et néglige la correction.

d'urine et sont exprimés en centimètres cubes de ClH décinormal :

Emploi de la chaux	Emploi de la magnésie	Nombre de cm ³ attribuables à NH ³
9,6	13,1	
8,5	11,6	
8,4	11,1	0,32
13,6	16,9	0,574
10,6	13,75	0,868
6,1	9	0,42
8,1	10,5	0,60
12,4	14	0,56
9,6	13	0,43
8,3	11,6	0,23
6,4	8,3	
8,4	8,9	
12,5	12,7	
14,8	14,8	
11,8	13,5	

On voit que les chiffres trouvés après défécation à la magnésie sont supérieurs à ceux trouvés après traitement à la chaux. On pouvait supposer que cet excès était dû à la présence de phosphates non complètement éliminés par le traitement à la magnésie, mais la recherche des phosphates sur la liqueur déféquée ne donne qu'une légère coloration jaune au réactif nitro-molybdique très comparable à celle que donne, dans les mêmes conditions, la liqueur traitée par la chaux. Les phosphates sont donc étrangers à l'augmentation des chiffres trouvés après traitement à la magnésie. D'autre part nous avons vu que l'ammoniaque intervient dans le dosage acidimétrique pour 7 p. 100 de sa teneur dans l'urine

(Van Slyke et Palmer [22]) ; or dans la méthode de Philibert l'ammoniaque est éliminée. La correction à effectuer vient donc augmenter le chiffre du dosage après traitement à la magnésie, cependant que la neutralisation en présence de la phtaléine, de la liqueur traitée par la chaux, subit un léger retard dû à la présence des sels ammoniacaux, d'où l'addition d'un petit excès de soude. D'ailleurs si on évalue acidimétriquement la valeur de cette ammoniaque disparue, celle-là est assez faible, de l'ordre de $0,5 \text{ cm}^3$ à $0,8 \text{ cm}^3$ d'acide décinormal. Nous verrons plus loin que les chiffres trouvés après ce mode de défécation à la magnésie se rapprochent de ceux obtenus sans aucun traitement préalable de l'urine si l'on défalque la valeur qui revient aux phosphates.

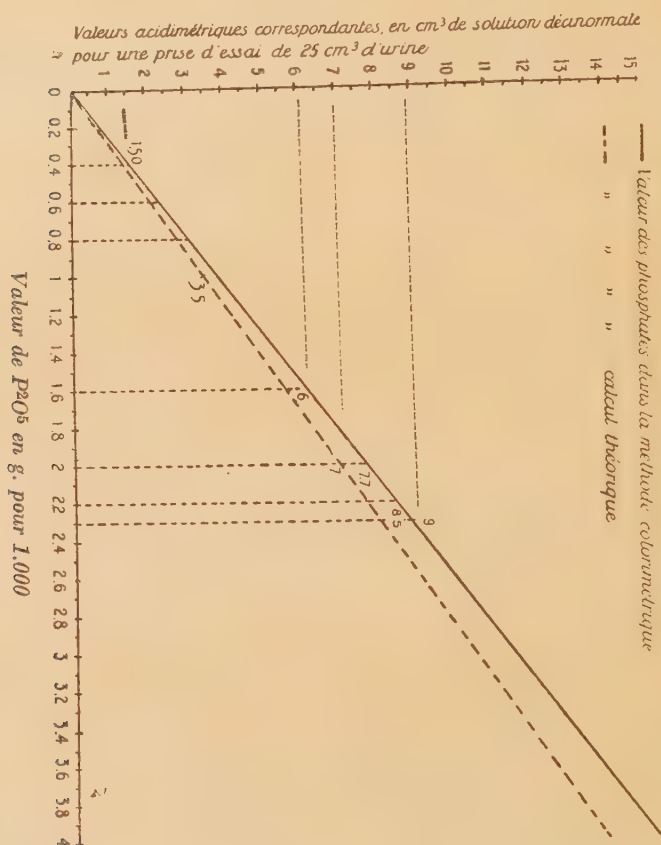
III. — Dosage d'une urine non traitée par défécation et comparaison avec une urine préalablement traitée par la chaux.

Nous avons utilisé jusqu'ici pour déféquer l'urine, la chaux, la baryte et la magnésie et nous avons vu que les résultats variaient suivant l'emploi de l'une ou de l'autre de ces bases. Le but de Van Slyke et de Palmer en utilisant la chaux, était d'éliminer des urines les phosphates et les carbonates dont les sels sont dosés dans un titrage acidimétrique qui prend pour terme $pH \text{ } 2,7$. Mais cette action de la chaux, et à plus forte raison celle de la baryte, est peut-être plus complexe qu'il ne semble d'après les

principes théoriques énoncés par les auteurs. Il y a un moyen assez simple de contrôler cette action des bases et en particulier de la chaux ; si nous partons d'une urine n'ayant subi aucun traitement préalable et que nous y pratiquions un dosage semblable à celui fait après défécation, les résultats diminués du chiffre qui revient aux phosphates, doivent être très voisins de ceux obtenus après défécation à la chaux ; la part qui revient aux carbonates, dans une urine d'un pH inférieur à 6 à 6,5 est suffisamment faible pour être négligée. Si ces résultats, corrigés comme nous venons de le dire, sont différents de ceux obtenus en traitant l'urine par la chaux, nous pourrions admettre que celle-ci entraîne d'autres éléments que les phosphates et les carbonates.

Commençons d'abord par opérer comme l'indique Grimbert [10] pour doser l'acidité urinaire, par un dosage direct sur l'urine en neutralisant simplement par la soude jusqu'au virage rose de la phtaléine. Arrivés à ce stade nous pouvons procéder à une sorte de dosage en retour par le ClH décinormal en employant comme indicateur l'orangé IV. Dans ce dernier cas, les carbonates contenus dans l'urine étant peu considérables, si nous dosons les phosphates et que nous retranchions leur valeur acidimétrique exprimée en centimètres cubes de solution décinormale, du nombre de centimètres cubes obtenus par titrage direct en présence d'orangé IV, nous devons pouvoir rapprocher les résultats de ceux obtenus par la méthode de Van Slyke et Palmer.

a) CALCUL DES PHOSPHATES. — Pour établir l'équivalence des phosphates en centimètres cubes d'acide décimormal, on les considère comme étant



à l'état disodique à pH 8 et ramenés à l'état de $\text{PO}_4 \text{NaH}^2$ à pH 2,7 (en grande partie) ; on les comptera comme étant monovalents, de sorte que le dosage des phosphates étant fait par la méthode à l'urane

et exprimé en P^2O^5 (P.M. = 142) on a 14,2 g. P^2O^5 = 2.000 centimètres cubes de soude décinormale, d'où 0,001 g. P^2O^5 = 0,1408 cm³ de soude décinormale.

En réalité les phosphates n'ont pas été évalués par ce calcul mais à l'aide d'une série de dosages faits sur une solution connue de phosphate en présence d'orangé IV et construction de la courbe correspondante. On constate alors que ces chiffres sont toujours un peu inférieurs à ceux obtenus par le calcul qui transforme comme il est indiqué ci-dessus PO^4M^2H en PO^4MH^2 , sans doute à cause de ce fait qu'au moment du virage de la phtaléine il y a environ 4,2 p. 100 des phosphates à l'état de PO^4MH^2 (voir ci-contre le graphique de la page 34).

b) TECHNIQUE : 1^o *Dosage des phosphates.* — Les phosphates ont été d'abord dosés par la méthode ordinaire à l'urane, mais le virage est souvent un peu incertain, et, étant donné que les chiffres trouvés doivent servir de base aux calculs ultérieurs, nous avons utilisé la méthode de Neumann en suivant la technique de Machebœuf [15].

La précipitation est faite sous forme de phosphomolybdate d'ammoniaque. Le précipité, lavé, est dissous dans l'ammoniaque, celle-ci est chassée par une quantité connue et en excès de soude N/25 à ébullition, puis on détermine la proportion de soude utilisée pour remplacer l'ammoniaque.

2^o *Dosage à l'orangé IV.* — Le dosage acidimé-

trique en présence d'orangé IV a presque toujours été fait deux fois, la seconde fois en versant le colorant à la fin de l'opération, d'un seul coup comme il a été dit au début.

c) COMPARAISON ENTRE LES RÉSULTATS TROUVÉS, SANS DÉFÉCATION PRÉALABLE ET APRÈS USAGE DE LA CHAUX.

Exemples de résultats obtenus avec et sans défécation préalable à la chaux exprimés en centimètres cubes d'acide décimormal sur 25 centimètres cubes de prise d'essai :

Sans défécation chiffres bruts	Correction due aux phosphates	Chiffres corrigés	Défécation à la chaux	Différence (p. 100)
20,10	5	15,1	13,25	13
27,1	9,45	17,65	16,8	5
19,5	5,1	14,4	12,6	14,2
25,8	7,1	18,7	16,8	11
24,8	7,1	17,7	17,2	3
21,1	5,1	16	14,8	8,1
20,1	5,8	14,3	11,5	24,1
22,9	5,8	17,1	14,5	18
30,8	9,05	21,75	17,3	25,7
18,5	5,65	12,85	12,3	4,4
27,8	6,5	21,3	21,1	0,9
23,5	5,5	18	15	20
19	6,2	12,8	11,8	8,3
18,6	4,4	14,2	14	1,4
17	3,5	13,5	11,9	13,5
21,6	3,85	17,75	15,3	16
20,3	4,75	15,55	12,5	24,4
22,2	5,3	16,9	10,3	64
18	4,8	13,2	10,9	21

d) CONCLUSION. — Les écarts trouvés entre les deux méthodes semblent bien indiquer dans un grand nombre de cas l'entraînement par la chaux de substances dosables acidimétriquement en présence d'orangé IV, en dehors des phosphates (et des carbonates dont nous ne nous sommes pas occupés. Mais l'erreur ainsi causée peut être, semble-t-il, le plus souvent négligée au point de vue pratique).

Dans les exemples que nous donnons ci-dessus, nous avons une diminution du taux apparent des acides organiques dans le dosage comportant une défécation à la chaux, qui est dans 7 cas inférieur à 10 p. 100 (rapport de la différence entre les deux modes de dosage et le chiffre du dosage après emploi de la chaux), dans 6 cas compris entre 10 et 20 p. 100, dans 5 cas entre 20 et 25 p. 100, seul l'avant-dernier exemple atteint 64 p. 100.

Erik M. P. Widmarck et Ewert Ljunberg [24] ont signalé en 1929 l'entraînement par la chaux de substances pouvant jouer un rôle acide dans la méthode de Van Slyke et Palmer. Cette perte apparente en acides organiques irait jusqu'à 36,4 p. 100

Nos expériences confirment donc complètement les conclusions de ces auteurs.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA DÉFÉCATION BASIQUE SUR L'ACIDE URIQUE URINAIRE

Nous avons vu que les résultats des dosages acidimétriques faits par colorimétrie étaient variables suivant la base utilisée pour la défécation préalable. Il est permis de supposer que ces différences sont dues à l'entraînement de substances dosables par acidimétrie à pH 2,7. Parmi celles-ci nous examinerons en particulier l'acide urique et les bases telles que la créatinine et la créatine. Après avoir vérifié que l'acide urique est dosé, dans la méthode de Van Slyke et Palmer, comme un acide monovalent, nous étudierons l'action de la chaux et de la baryte en procédant sur un même échantillon d'urine, au dosage de l'acide urique avant tout traitement, puis après contact avec l'une des deux bases étudiées. Nous verrons, que dans ces conditions la teneur en acide urique diminue de façon notable sous l'influence de la chaux et disparaît presque totalement avec la baryte. Ceci nous amènera à faire intervenir la question du temps de contact duquel dépendent les variations observées.

a) DÉTERMINATION DU RÔLE ACIDIMÉTRIQUE DE L'ACIDE URIQUE.

Tout d'abord voyons comment se comporte l'acide urique en solution aqueuse en tant qu'acide. Un poids connu d'acide est mis en suspension dans l'eau, il est dissous par la soude décimale en présence de phtaléine, puis dosé par l'acide chlorhydrique décimormal avec l'orangé IV comme indicateur. L'acide urique se reprécipite au fur et à mesure, mais le dosage est cependant possible.

Le calcul théorique, considérant l'acide urique comme monovalent, soit 168 grammes = 10.000 centimètres cubes de soude décimale, nous donnait 10,0 et 5,0 là où l'expérience nous a fait trouver 10,6 et 5,25. On a donc une petite erreur qui semble proportionnelle à la quantité mise en œuvre, mais en première approximation, on peut admettre que, vis-vis de l'orangé IV, l'acide urique se conduit comme monovalent.

b) TECHNIQUE DU DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE.

Le dosage de l'acide urique dans l'urine est fait sur 10 centimètres cubes (Danet [3]). On laisse l'urine en contact 1/2 heure avec 1,50 g. de chlorhydrate d'ammoniaque et 1,5 cm³ d'ammoniaque pure. Après ce temps on centrifuge et décante. Le précipité est remis en suspension dans 2 centimètres cubes d'un liquide de composition analogue à celui qui a servi à sa formation. Soit :

{ NH ⁴ Cl	150 g.
{ Ammoniaque	150 cm ³
{ Eau q. s. p.....	1.000 cm ³

On centrifuge à nouveau, on décante, le précipité ainsi lavé est dissous dans quelques gouttes d'acide acétique au dixième puis dilué dans 30 centimètres cubes d'eau (la dissolution est beaucoup plus facile ainsi, que si l'on commence par mettre le précipité en suspension dans l'eau) puis on verse 2 centimètres cubes de solution saturée de bicarbonate de soude, on dose alors à l'aide d'une solution d'iode cinquantième normale en présence d'empois d'amidon en utilisant une microburette ou au moins une burette graduée en vingtième de centimètres cubes. Soit n centimètres cubes d'iode cinquantième normal la quantité d'acide urique par litre est exprimée par la formule

$$(n \times 0,168) + 0 \text{ g. } 01.$$

Nous exprimerons les résultats soit directement en centimètres cubes d'iode cinquantième normale, soit en centimètres cubes d'acide décimal en considérant l'acide urique comme monovalent (1).

c) TABLEAU DES DOSAGES DE L'ACIDE URIQUE PRATIQUÉS SUR L'URINE ET SUR L'URINE TRAITÉE PAR LA CHAUX OU PAR LA BARYTE :

(1) 1 centimètre cube d'iode cinquantième normal est équivalent de 0 cm³ 1 d'acide décimal pour une prise d'essai de 10 centimètres cubes d'urine.

En cm ³ d'iode N/50 pour 10 cm ³ d'urine		
Urine seule	(Urine + chaux)	(Urine + baryte)
1,34	1,07	0,19
2,68	1,95	0,60
1,45	1,15	0,30
2,5	1,775	0,325
1,675	0,80	
2,25	2,05	0,2
1,4	1,4	0,3
1,15	1	0,17
2,45	2	0,3
0,95	0,5	0,25
2,35	2,35	0,9

Ce tableau montre que l'acide urique est en général légèrement entraîné par la chaux et presque totalement par la baryte. Les chiffres fournis ne dépassent pas en général 0,30 (9 fois sur 11).

Il était assez intéressant de savoir si on pouvait retrouver l'acide urique dans le précité calcique ou barytique. En le dosant, dans l'urine telle que, et dans l'urine traitée par la baryte ou la chaux, puis dans les précipités correspondants, le total des deux derniers dosages a été sensiblement égal à celui pratiqué sur l'urine non déféquée, ce qui montre bien que l'acide était entraîné dans le précipité dû à la défécation basique.

Ayant constaté que nos expériences, répétées sur un même échantillon d'urine en cours de traitement par la chaux ou la baryte, nous donnaient des chiffres variables, nous avons été amené à penser

que l'entraînement de l'acide urique pouvait varier avec le temps de contact. C'est pourquoi nous avons étudié l'entraînement de l'acide urique en fonction du temps.

d) ÉTUDE DE L'ENTRAÎNEMENT DE L'ACIDE URIQUE EN FONCTION DU TEMPS.

Technique : a) L'urine est mise en contact avec la chaux et prélevée à des intervalles de temps connus ; b) Pour le traitement à la baryte on opère sur un volume assez grand pour permettre plusieurs prélèvements : prendre :

Urine	100 cm ³
Sol. de phtaléine	1 goutte
BaCl ²	4 g.
Eau de baryte q. s. p. avoir la coloration rose	
Eau de baryte	10 cm ³
Eau distillée	200 cm ³

On prélève aux temps indiqués.

A la liqueur, soit 10 centimètres cubes ou 20 centimètres cubes dans le cas de la baryte, on ajoute :

NH ⁴ Cl	1 g. 50
Ammoniaque	1 cm ³ 50

On laisse en contact 1/2 heure et l'on termine le dosage de l'acide urique comme il est indiqué.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Entraînement de l'acide urique par la chaux :
L'urine sur laquelle nous avons fait agir la chaux avait une teneur en acide urique correspondant à 2,5 cm³ d'iode N/50 (sur 10 cm³) :

Temps de contact	Acide urique restant dans l'urine
10 minutes	1,95
15 minutes	1,75
25 minutes	1,675
30 minutes	1,675
1 heure	1,60
1 heure un quart	1,60
24 heures	1,25

Entraînement de l'acide urique par la baryte :

Temps de contact	Acide urique restant dans l'urine
6 minutes	0,75
15 minutes	0,60
20 minutes	0,452
30 minutes	0,20
1 heure	0,10
1 heure trois quarts	0,055

L'acide urique disparu a été retrouvé dans les précipités calcique et barytique correspondants.

L'ensemble de ces expériences montre qu'une heure de contact est suffisante pour avoir un entraînement pratiquement maximum de l'acide urique.

e) INFLUENCE DE LA CHAUX ET DE LA BARYTE, COMPARAISON APRÈS UNE HEURE DE CONTACT DES DIFFÉRENTS DOSAGES ACIDIMÉTRIQUES ET RÔLE QU'IL FAUT ATTRIBUER A L'ACIDE URIQUE :

Dosage des acides organiques, exprimés en centimètres cubes de solution décimorale et dosage

de l'acide urique contenu dans les mêmes prélèvements de 25 centimètres cubes exprimé aussi en centimètres cubes de solution acide décinormale :

Urine sans défécation basique (après correction des phosphates)		Défécation à la chaux				Défécation à la Baryte			
		Acides organiques	Différence acidimétrique	Attribuable à l'acide urique	Différence acidimétrique due à la perte d'acide urique	Acides organiques	Différence acidimétrique	Attribuable à l'acide urique	Différence acidimétrique due à la perte d'acide urique
12,8	0,7	12	0,8	0,35	0,35	4,5	8,3	0	0,7
12	0,6	9,6	2,4	0,35	0,25	7,5	4,5	0	0,60
12,4	0,96	11,7	0,7	0,7	0,26	9,5	2,9	0	0,96
14,35	0,6	13,5	0,85	0,4	0,2	9,3	5,05	0	0,6
5,6	0,25	4,25	1,35	0,1	0,15	4	1,6	0	0,25
13,65	0,6	11	2,65	0,4	0,2	9,7	3,95	0	0,6

Nous voyons par ce tableau que : 1° Si la disparition de l'acide urique intervient pour diminuer la valeur des dosages acidimétriques dans la technique classique de Van Slyke et Palmer à la chaux, sa part est petite et ne suffit pas à expliquer la différence que nous avons observée précédemment entre les résultats du dosage classique et ceux qu'on obtient en opérant sur l'urine telle que et en diminuant les résultats de la part qui revient aux phosphates ; 2° Les différences observées entre les résultats obtenus selon que l'on emploie comme défécant soit

la chaux soit la baryte sont d'un ordre de grandeur plus élevé que celles qui reviennent à la différence d'entraînement de l'acide urique par ces deux déféquants.

CHAPITRE V

INFLUENCE DE LA DÉFÉCATION BASIQUE SUR LA CRÉATINE ET LA CRÉATININE

a) RÔLE ACIDIMÉTRIQUE DE CES DEUX BASES

Il convient d'abord, comme nous l'avons fait pour l'acide urique, de savoir comment se comportent la créatine et la créatinine dans un dosage acidimétrique tel que celui de la méthode de Van Slyke et Palmer.

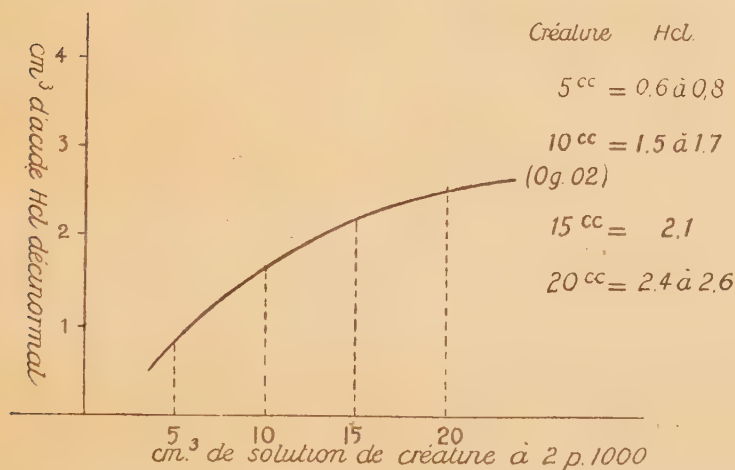
1° *La créatinine* ($C^4H^7N^3O$).

Nous partons d'une solution de créatinine à 1 p. 1.000 amenée au virage de la phtaléine avec de la soude N/25 ; elle est ensuite conduite au pH 2,7 avec de l'acide ClH vingtième normale en présence d'orangé IV, 20 centimètres cubes de cette solution nécessitent 3,6 cm³ d'acide vingtième normal ; la théorie prévoit 3,54, d'autres dosages se montrent aussi concordants, la créatinine se comporte donc comme étant monobasique et on dose 100 p. 100 de ce corps en présence d'orangé IV en poussant jusqu'au pH 2,7. Le poids moléculaire de la créatinine étant 113, 113 grammes correspondent à

10.000 centimètres cubes de soude décinormale et 1 gramme à 88,5 cm³ de soude décinormale. Un calcul simple permettra d'attribuer dans le dosage des acides organiques la part qui revient à la créatinine.

2° *La créatine* (C⁴H⁹N³O³).

Pour celle-ci les auteurs ne sont pas d'accord quant au pourcentage de ce qui est dosé acidimétriquement.



Nous avons opéré comme pour la créatinine ; le poids moléculaire de la créatinine est 131, 1 gramme représente 76,33 cm³ de soude décinormale ; nous avons trouvé les chiffres suivants mis en regard des résultats théoriques correspondant à un dosage de 100 p. 100.

0,6 à 0,8	au lieu de	1,53
1,5 à 1,7	»	3,06
2,1	»	4,59
2,4 à 2,6	»	6,12

ce qui donne les pourcentages suivants : 45,7 p. 100, 52,2 p. 100, 45,7 p. 100, 37,6 p. 100. On ne dose donc que 40 à 50 p. 100 de la créatine et, semble-t-il, ces chiffres s'abaissent quand la concentration augmente (*Voir la courbe de la page 47*).

b) ACTION DE LA CHAUX SUR LA CRÉATININE

En possession des données précédentes, il nous a semblé intéressant d'examiner ce que deviennent la créatinine et la créatine pendant et après le traitement par la chaux.

Etude des variations de la créatinine

Le dosage est fait par colorimétrie en prenant comme témoin une solution de bichromate de potassium à 24,54 p. 1000 que l'on examine au colorimètre de Duboscq sous une épaisseur de 8,5 mm. Cependant, les couleurs ne sont pas tout à fait comparables et il peut être préférable de prendre une solution de créatinine à 1 p. 1.000 à laquelle on fait subir les mêmes opérations qu'au liquide étudié ; on compare sous une hauteur de 18 millimètres.

Le dosage sera fait d'une part directement sur l'urine telle que, puis sur la même urine déféquée à la chaux, après des temps de contact variables avec cette base ; on constate alors très facilement que l'urine traitée par la chaux est moins riche en créatinine et d'autant moins que le temps de contact

a été plus long : en effet partant d'une solution à 1 p. 100 nous avons trouvé après une demi-heure de contact avec la chaux :

temps :	créatinine : résultats en g. pour 1.000
1 demi-heure	1
6 heures	0,87
48 heures	0,467

en opérant sur de l'urine nous avons eu les résultats ci-dessous :

1 ^o Temps de contact	créatinine : résultats en g. pour 1.000 cm ³ d'urine
Teneur en créatinine avant action de la chaux.	0,70
Un quart d'heure avec la chaux	0,51
1 heure	0,43
24 heures	0,40
2 ^o Teneur primitive en créatinine.....	0,63
24 heures	0,42
3 ^o Teneur en créatinine.....	0,66
Près de 24 heures de contact avec la chaux..	0,33

Nous constatons en même temps que l'alcalinité de la liqueur a augmenté : Exemples :

Teneur primitive en créatinine	Temps de contact	Teneur en créatinine après ce temps	Alcalinité correspondante
0,53	20 min.	0,48	
	6 heures	0,47	11,2 cm ³
	12 heures	0,28	12 »
1,05	20 min.	0,97	
	6 heures	0,95	11,2 cm ³
	24 heures	0,75	12 »
	48 heures	0,71	12 »
0,76	18 heures	0,63	8,7 »
	30 heures	0,50	9,1 »
	3 jours	0,40	
0,84	18 heures	0,68	9,4 cm ³

L'hypothèse la plus simple pour expliquer cette disparition de la créatinine était d'admettre sa transformation en créatine grâce à l'alcalinité de la chaux. Pour vérifier notre hypothèse nous avons dosé la créatine avant et après action de la chaux de façon à nous rendre compte si la disparition de la créatinine était compensée par la formation de créatine.

Pour doser la créatine, on transforme par anhydri-
sation la créatine, qui ne réagit pas sur l'acide pi-
crique, en créatinine et on dose cette dernière comme
précédemment. Ces diverses manipulations amènent
à certaines dilutions avant le dosage colorimétrique ;
nous avons étudié, dans les différents temps du
dosage, l'influence possible des changements de
volume initiaux sur l'exactitude de dosage de la
créatinine.

c) ÉTUDE DU DOSAGE DE LA CRÉATININE : IN-
FLUENCE DE LA DILUTION DU LIQUIDE A DOSER.

Le dosage de la créatinine est pratiqué de la façon
suivante. On prend :

Urine	1 cm ³
Solution d'acide picrique purifié à 12 p. 1000. .	1,5 cm ³
Soude à 10 p. 100	0,5 cm ³

on laisse en contact 5 à 10 minutes et on complète
à 50 centimètres cubes.

Nous avons pratiqué ce dosage en introduisant
ce centimètre cube d'urine amené au préalable à
des dilutions variables, autrement dit nous diluons
l'urine au moment du temps de contact ; nous par-

tons du même volume d'urine auquel nous ajoutons 0,2, 5,10, 30 centimètres cubes d'eau et nous laissons en contact avec l'acide picrique pendant le même temps, 10 minutes, puis nous complétons au volume final de 50 centimètres cubes. On observe au colorimètre les hauteurs suivantes (le témoin à 1 p.1000 est mis à 18 millimètres de hauteur).

cm ³ d'eau ajoutés	hauteurs lues
0	17 à 18
2	20
5	24
10	41
30	lecture impossible

PROLONGATION DU TEMPS DE CONTACT AVEC L'ACIDE PICRIQUE

La non dilution a donc une importance capitale pendant la première partie du dosage, mais il est sans doute possible de diminuer l'effet de la dilution par une prolongation du temps de contact. Nous reprenons l'expérience précédente en ajoutant 5 centimètres cubes d'eau à l'urine avant l'addition des autres réactifs et nous lisons nos résultats en fonction du temps :

Temps de contact avec l'acide picrique	Addition préalable d'eau à 1 cm ³ d'urine	Hauteurs lues
8 minutes.....	5 cm ³	22
15 minutes.....	»	19
36 minutes.....	»	19
5 minutes.....	10 cm ³	63
20 minutes.....	»	22,4
35 minutes.....	»	21
24 minutes.....	»	21

On peut donc compenser l'influence de la dilution primitive en augmentant les temps de contact de l'urine avec l'acide picrique et la soude ; cependant au cours des expériences ultérieures il nous est arrivé de constater qu'un temps de contact trop long de la soude amenait une atténuation de la teinte.

d) DOSAGE DE LA CRÉATINE.

Après divers essais nous avons employé la méthode de Myers : [17].

A un volume d'urine ajouter un demi volume d'acide ClH normal, chauffer 15 minutes à 117° à l'autoclave ; neutraliser et pratiquer le dosage de la créatinine formée comme à l'ordinaire, le chiffre trouvé est multiplié par 1,16. La créatine ne donne pas de coloration avec l'acide picrique.

D'après ce que nous avons dit précédemment il faudra veiller à ce que l'introduction de l'acide nécessaire à l'hydrolyse et ensuite sa neutralisation réduisent au minimum l'augmentation du volume. La solution de créatine servant de témoin est à 0,10% et le temps de contact avec l'acide picrique sera d'au moins 20 minutes. On utilise une solution de soude suffisamment concentrée pour neutraliser l'acide ayant servi à l'hydrolyse. 0,4 cm³ de cette solution sodique correspondent à 1 centimètre cube d'acide ClH normal. Nous établissons l'expérience comme suit :

a) sol. de créatine	1 cm ³
ClH normal	0,50 cm ³

15 minutes à l'autoclave à 117°.

b) soude pour neutraliser ClH normal	0,2 cm ³
soude réactif à 10 p. 100.....	0,5
acide picrique en solution 12 p. 1.000....	1,5 cm ³
volume total	3,70 cm ³

Quand il s'agira de l'urine traitée par la chaux, il faudra la neutraliser avant l'hydrolyse (la quantité d'acide nécessaire pour cela sera déterminée par un dosage à part) exemple :

a) urine traitée par la chaux.....	1 cm ³
ClH q. s. p. ramener au rose pâle de la phtaléine, soit.....	1 cm ³
ClH N (1/2 du volume ci-dessus) soit :....	1 cm ³
b) soude concentrée pour neutraliser ClH N.	0,4 cm ³
soude réactif à 10 p. 100.....	0,5 cm ³
solution d'acide picrique à 12 p. 1.000.	1,50 cm ³

e) VARIATIONS SIMULTANÉES DE LA CRÉATINE ET DE LA CRÉATININE ET MODIFICATIONS ACIDIMÉTRIQUES CONSÉCUTIVES.

Ayant dosé la créatine et la créatinine sur l'urine telle quelle et sur l'urine traitée par la chaux nous arrivons aux résultats suivants : *Voir le tableau de la page 54.* Nous désignons sous le terme de « créatinine totale » la somme de la créatinine préexistante et celle qui provient de la créatine après chauffage à l'autoclave.

La créatinine se transforme donc en créatine sous l'influence du traitement par la chaux et par anhydri- sation nous la récupérons sensiblement.

Cette transformation entraîne une légère modifica-

tion dans un dosage acidimétrique puisque la créatinine est dosée en totalité tandis que la créatine ne l'est que dans la proportion de 40 à 50 p. 100, soit en moyenne 45 p. 100, par conséquent la variation acidimétrique observée représente (100—45) soit 55 p. 100 de la perte en créatinine.

Teneur en g. de créatinine pour 1.000 cm ³ d'urine			
Urine sans aucun traitement		Urine traitée par la chaux	
Créatinine	Créatinine totale	Créatinine	Créatinine totale
0,82	1,17	0,54	0,95
1,12	1,38	0,75	1,38
0,89	0,97	0,71	0,95

1 gramme de créatinine représente 88,5 de soude décinormale, si cette créatinine est dissoute dans un litre, une prise d'essai de 25 centimètres cubes représentera 2,2125 cm³ ; si cette créatinine est transformée intégralement en créatine la perte est de $2,21 \times 0,55 = 1,21$ cm³ ; il suffit de faire les deux dosages de la créatinine avant et après le traitement par la chaux et de multiplier par 1,21 la différence des deux dosages, exprimée en grammes par litre, pour connaître la variation acidimétrique en centimètres cubes de solution acide décinormale pour 25 centimètres cubes de prise d'essai.

Teneur en créatinine en g. p. 1000			Variation de l'acidité en cm ³ de solution N/10 pour 25 cm ³ d'urine
Sur l'urine sans traitement	Après contact avec la chaux	Différence	
1,131	0,746	0,385	×1,21=0,465
0,818	0,545	0,273	=0,33
1,125	0,750	0,375	=0,45
0,891	0,711	0,180	=0,217

CONCLUSION : Ces expériences montrent que, dans l'ensemble, la perturbation apportée au dosage par l'hydrolyse de la créatinine reste très faible et ne suffit pas seule à expliquer la différence qui existe entre un dosage acidimétrique fait sur l'urine par colorimétrie soit directement, soit après traitement par la chaux. Le traitement à la chaux contribuera simplement à diminuer légèrement l'importance du rôle de ces deux bases.

CHAPITRE VI

CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

Cette première partie de notre travail a eu principalement pour but de mettre au point certains détails de la méthode de Van Slyke et Palmer.

Un premier point important était de pouvoir remplacer l'orangé IV, quand il est décoloré ou précipité, par un autre indicateur virant dans la même zone de pH et donnant des résultats sensiblement identiques, le bleu de para xylénol peut facilement remplacer l'orangé IV.

Un point plus important était de connaître le rôle de la chaux ou d'autres bases susceptibles de la remplacer dans la défécation qui précède le dosage. Si à la chaux, on substitue, soit de la magnésie, soit de la baryte, les résultats du dosage des acides organiques exécuté sur une même urine sont légèrement différents et, dans le cas de la magnésie, plus élevés que ceux donnés par la chaux. Il ressort de notre comparaison entre les dosages après traitement à la chaux et ceux faits sans défécation préalable sur l'urine et diminués de la valeur qui revient aux phos-

phates que la chaux entraîne autre chose que les phosphates et les carbonates, et parmi les substances pouvant être ainsi entraînées ou modifiées se trouvent l'acide urique et les bases faibles, la créatinine et la créatine. L'acide urique est plus ou moins entraîné et la créatinine transformée partiellement en créatine qui joue un rôle moindre au point de vue acidimétrique. Mais en tenant compte de toutes ces corrections il ressort que la chaux modifie ou entraîne encore d'autres substances qui ne rentrent peut-être pas dans la catégorie des acides organiques, mais qui sont dosables acidimétriquement par colorimétrie à $pH\ 2,7$ abaissant ainsi le taux apparent des acides organiques urinaires, tel que nous le donne la méthode de Van Slyke et Palmer.

Dans la seconde partie de notre travail nous allons aborder l'étude d'autres méthodes de dosage des acides organiques urinaires basées sur des principes différents et les comparer avec celle de Van Slyke et Palmer.

DEUXIÈME PARTIE

MÉTHODE DE HEHNER COMPARAISON AVEC LA MÉTHODE DE VAN SLYKE ET PALMER

DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES URINAIRES AU MOYEN DE LA MÉTHODE DE HEHNER (1)

La méthode de Hehner pour le dosage des acides organiques utilise la transformation sous l'influence de la chaleur (rouge naissant) de leurs sels de sodium en carbonate de sodium que l'on peut titrer alcalimétriquement. Cette méthode a été appliquée dès 1882 [21], par Seeman au dosage des acides organiques du suc gastrique.

Nous avons pensé qu'il y avait quelque intérêt à

(1) Cette partie de notre travail a été faite en collaboration avec M. P. Fleury et a donné lieu à une publication sous nos deux noms (*Société de Pharmacie de Paris*, séance du 3 mars 1937).

tenter d'appliquer cette même méthode au dosage des acides organiques de l'urine, ne serait-ce que pour permettre la comparaison éventuelle des résultats donnés par cette méthode relativement très spécifique, avec ceux de la méthode de Van Slyke et Palmer.

Nous avons rencontré dans son application à l'urine de nombreux obstacles. Nous y insisterons seulement dans la mesure où la solution de ces difficultés présente quelque intérêt.

Pour plus de clarté, nous donnerons d'abord la technique à laquelle nous avons finalement abouti. Nous expliquerons ensuite les raisons de ses diverses particularités. Nous en donnerons la justification, enfin nous exposerons les résultats qu'elle nous a donnés.

I. — Partie technique.

a) TECHNIQUE.

Dans une fiole conique de 150 à 200, mesurer exactement :

Urine filtrée.....	50 cm ³
Sol. décimale de soude.....	75 cm ³

Mélanger. Filtrer dans une fiole d'Erlenmeyer ou une éprouvette. Sur le filtrat, on exécute 2 séries d'opération distinctes. Sur une première série d'essai, on détermine ce que nous appelons conventionnellement *l'acidité totale* AT représentée

par la somme de deux valeurs : 1^o La quantité de soude nécessaire pour neutraliser l'urine primitive à la phtaléine, que nous nommons l'*acidité libre* de l'urine AL et : 2^o La quantité de soude qu'il faut ajouter à nouveau à cette urine déjà neutralisée et additionnée de formol pour amener le virage de la phtaléine, que nous nommerons l'*acidité au formol* AF.

D'autre part on fait subir à une deuxième série d'essai du filtrat un traitement qui est une mise en œuvre du principe de Hehner pour le dosage des acides organiques.

1^{re} Détermination. — Acidité totale $AT = AL + AF$.

Mesurer dans une fiole à précipitation de 100 centimètres cubes, 25 centimètres cubes du filtrat (ce qui correspond à 10 centimètres cubes d'urine et à 15 centimètres cubes de solution décimale de soude). Ajouter 15 centimètres cubes de solution d'acide sulfurique ce qui correspond ainsi *au volume de soude introduit*. Le liquide acide ainsi obtenu est additionné de cinq gouttes d'une solution alcoolique de phtaléine à 1 p. 100, de solution décimale de soude jusqu'à coloration rose pâle = φ centimètres cubes qui représentent l'acidité libre AL. Ajouter alors 30 centimètres cubes d'une dilution au demi de la solution de formol du Codex préalablement neutralisée à la phtaléine et, sans recharger la burette, titrer la nouvelle acidité qui s'est développée, soit φ' le nombre *global* de centimètres cubes utilisé. Ce chiffre φ' représente l'acidité

totale AT, et, dans ces conditions, l'acidité formol AF est représentée par AT-AL c'est-à-dire $\varphi'-\varphi$.

2^e Détermination. — Dans une capsule en platine à fond plat de 70 millimètres cubes de diamètre mesurer 25 centimètres cubes du filtrat. Évaporer à sec au bain-marie de façon à obtenir une dessiccation aussi poussée que possible. Introduire dans un four à moufle froid et élever progressivement la température en 20-25 minutes environ jusqu'au rouge et maintenir jusqu'à disparition de la plus grande partie du carbone (15 à 30 minutes d'ordinaire).

La persistance de quelques particules de carbone n'a pas d'inconvénient. Laisser refroidir et mesurer dans la capsule 15 centimètres cubes de solution décimale d'acide sulfurique ce qui correspond à la soude primitivement introduite dans le prélèvement de 25 centimètres cubes.

Mettre au bain-marie bouillant 4 à 5 minutes et frotter énergiquement les parois avec un agitateur muni d'un doigt de caoutchouc (1). Transvaser quantitativement dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 centimètres cubes à l'aide de 50 centimètres cubes d'eau contenant cinq gouttes de phtaléine. Les dernières fractions de cette eau utilisée pour le rinçage de la capsule ne doivent pas se colorer en rose au contact

(1) Si à ce moment le liquide présente une teinte rose qui indique par conséquent une quantité insuffisante d'acide, on ajoute 5 centimètres cubes de la solution décimale d'acide sulfurique. Naturellement on en tiendra compte dans les calculs comme il est indiqué plus loin. La valeur N ne sera donc plus 15 centimètres cubes mais 20 centimètres cubes.

des parois de la capsule de platine même en les frottant avec l'agitateur. Grâce à cette précaution, on est sûr de ne laisser aucune trace d'alcali fixée sur les parois du récipient. Faire bouillir 2 à 3 minutes pour chasser l'acide carbonique, refroidir rapidement dans un courant d'eau froide. Ajouter un volume d'une solution environ décimorale de sulfate neutre d'ammonium égal au volume représentant l'acidité formol AF de la 1^{re} détermination (pour avoir la même erreur de virage à la phtaléine que dans cette 1^{re} détermination) et titrer l'acidité persistant alors à l'aide d'une solution décimorale de soude jusqu'à coloration rose-pâle.

Soit N' le volume ainsi utilisé, exprimé en centimètres cubes.

B) CALCUL.

En résumé, après évaporation et incinération de l'urine à laquelle on a ajouté un volume n de solution décimorale de soude calculé comme précédemment (soit 15 centimètres cubes), on ajoute un volume N d'acide sulfurique décimormal ; ce volume N sera au moins égal au volume n de soude ajouté précédemment ; après ébullition et refroidissement, le milieu étant alors acide, on titre cette acidité à l'aide de soude décimorale en présence de phtaléine ; on utilise ainsi un volume N' . Autrement dit, on détermine par retour l'*alcalinité* de la solution obtenue après incinération ; cette alcalinité A est mesurée par la différence $N - N'$.

Supposons qu'il n'existe pas dans l'urine d'acides organiques ; dans ce cas *il n'y a pas de soude libérée* au cours de l'incinération. La détermination de l'alcalinité A du liquide après l'incinération ne mesurera pas autre chose que le volume de soude qui a été ajouté *en plus* de celle qui a été nécessaire :

1^o *Pour saturer à la phtaléine* : l'acidité de l'urine (c'est-à-dire l'acidité libre AL).

2^o *Pour remplacer l'ammoniaque chassée par l'évaporation* (c'est-à-dire l'acidité au formol AF).

Rappelons que nous avons appelé acidité totale AT la somme de AL et de AF, donc, dans l'hypothèse d'absence totale d'acides organiques ; l'alcalinité de la solution après incinération, soit $N - N'$, serait donc égale à n (la quantité de soude introduite avant incinération) — AT.

Supposons maintenant que l'urine contienne des acides organiques ; donc *de la soude se trouve libérée* pendant l'incinération en quantité proportionnelle à la teneur de l'urine en acides organiques : l'alcalinité du liquide doit donc augmenter : donc après addition de N centimètres cubes d'acide, la quantité d'acide consommé par l'alcalinité du milieu doit augmenter et N' , la quantité de soude versée pour neutraliser l'acidité restante, doit diminuer, donc l'alcalinité traduite par la différence $N - N'$ devient égale à $(n - AT) + AO$ (I). On en déduit :

$$AO = N - N' - (n - AT)$$

$$AO = N - N' - n + AT$$

$$AO = AT - N' + N - n.$$

Remarque. — Dans le cas particulier où on a ajouté au liquide incinéré un volume N d'acide sulfurique égal au volume n de soude introduit avant incinération, on a alors la relation plus simple :

$$AO = AT - N'$$

C'est d'ailleurs le cas le plus général. On est averti que l'on se trouve dans un cas exceptionnel lorsque, ayant ajouté N d'acide sulfurique en quantité égale à n , on constate que le milieu reste alcalin : ce dernier cas se produit lorsque la quantité d'alcali libéré par incinération AO exprimée en centimètres cubes de sel décinormale, est plus grande que ce que nous avons appelé l'acidité totale AT . On conçoit, en effet, que dans le cas où le milieu après addition de volume d'acide en quantité égale au volume l'alcali serait neutre, cela voudrait dire que la soude libérée par destruction des acides organiques suffirait tout juste pour : d'une part compenser l'ammoniaque qui s'est éliminée (AF) et d'autre part saturer à la phtaléine l'acidité primitive de l'urine (AL), ce qui représente bien ce que nous avons appelé l'acidité totale (AT).

II. — Explication de la technique.

a) INTERVENTION DES PHOSPHATES.

La présence de phosphates dans l'urine constitue un premier obstacle, car si l'on se contente de neutraliser à la phtaléine par la soude, de façon à transformer tous les sels organiques en sels neutres comme

on le fait dans la méthode de Hehner sous sa forme classique, les phosphates sont à l'état de sels di-alcalins et au cours de l'incinération se transforment en pyrophosphates.

Pour éviter cet inconvénient nous avons pensé à transformer, par addition d'une quantité suffisante de soude titrée, les phosphates en sels tri-alcalins qui ne subissent pas la transformation en pyrophosphates sous l'influence de la chaleur.

b) INTERVENTION DE L'AMMONIAQUE.

Les sels ammoniacaux, soumis à l'incinération, subissent soit une volatilisation totale si l'union le permet (SO^4 , Cl) soit une décomposition avec perte d'ammoniaque dans les autres cas (exemple : phosphate). Si l'on opère en présence d'un excès d'alcali fixe, tous les anions restent sous forme de sels et la quantité d'alcali ainsi disparue est évidemment proportionnelle à la quantité d'ammoniaque primitivement présente.

Les sels ammoniacaux ne seront donc pas une entrave à l'application de la méthode de Hehner à condition d'opérer en présence d'un excès d'alcali et de défalquer, dans les calculs, la quantité de soude fixée par les anions salifiés au début par l'ammoniaque, un dosage préalable de l'ammoniaque permettant de connaître sa quantité.

c) INTERVENTION DU CALCIUM ET DU MAGNÉSIUM.

Les sels de calcium provoquent des perturbations

particulièrement en présence des phosphates comme précisément c'est le cas dans l'urine. On sait en effet que lorsqu'on neutralise à la phtaléine une solution de phosphate en présence d'un sel de calcium, il se précipite progressivement du phosphate tricalcique. Or, la formation de ce composé où *le troisième OH est saturé*, dans une zone de *pH* correspondant à la formation d'un phosphate seulement di-alcalin, ne peut se faire qu'en consommant une quantité d'alcali supérieure à celle qui est nécessaire pour le virage en l'absence de sel de calcium. Cette particularité explique pourquoi L. Grimberty et Morel, [10] dans leur étude de l'acidité urinaire, avaient été amenés à éliminer les sels de calcium. A ce premier inconvénient s'en ajoute un deuxième. Comme nous avons été amené à incinérer l'urine en présence d'un excès d'alcali, cette incinération a pour effet d'insolubiliser plus ou moins parfaitement le phosphate tricalcique formé à la suite de l'addition d'un excès de soude, l'addition d'acide titré ne redissout alors que partiellement le résidu après incinération. Il reste donc dans l'insoluble des quantités variables d'alcali, ce qui donne lieu à une nouvelle erreur.

Le magnésium toujours présent dans l'urine à côté du calcium amène des difficultés analogues.

Pour tourner cet obstacle, nous utilisons la particularité suivante : nous avons vu que la présence des phosphates et de l'ammoniaque nous forçait à opérer notre incinération en présence d'une quantité de soude telle qu'elle assure la transformation de

l'acide phosphorique en phosphate trialcalin et qu'elle couvre la perte de l'ammoniaque.

Or cette addition de soude donne lieu à la formation d'un précipité qui est constitué pour la plus grande part par du phosphate tricalcique. Il est donc possible par filtration de se débarrasser du calcium. L'entraînement de l'acide phosphorique n'a pas pour nous d'inconvénients, car la quantité d'acide phosphorique n'intervient pas dans nos calculs. Il suffit qu'un dosage préalable nous permette de calculer le minimum de soude à ajouter pour obtenir sa transformation en sel trialcalin. Mais la formation du précipité donne lieu, comme nous l'avons fait remarquer plus haut, à la consommation d'une certaine quantité d'alcali comme il nous a été facile de le vérifier. Si donc nous faisons intervenir dans nos calculs, la quantité de soude nécessaire pour amener l'urine au virage de la phtaléine (acide libre, ou AL), point qui nous sert de base pour nos déterminations alcalimétriques, nous commettons une erreur car notre filtrat a été appauvri en alcali aux dépens du précipité. C'est pourquoi nous procédons dans la 1^{re} phase de notre technique à la détermination de cette valeur (Acide libre ou AL) *sur le filtrat* en ajoutant à une portion aliquote du filtrat la quantité calculée d'acide pour neutraliser exactement l'alcali ajouté dans cette portion aliquote avant filtration, et nous ajoutons au liquide acide ainsi reconstitué la quantité de soude nécessaire pour amener le virage de la phtaléine. Nous savons que cette nouvelle

valeur de l'acidité libre AL, obtenue en somme par retour, est plus grande que celle que nous aurions obtenue par détermination sur l'urine elle-même, car elle englobe l'alcali resté dans le précipité ; mais ce fait n'a pas d'importance pour notre dosage, car seul compte pour nous le virage de la phtaléine et l'essentiel est d'éviter au cours de l'incinération une disparition d'alcali par insolubilisation du *phosphate tricalcique* et aussi du phosphate trimagnésien (1).

d) CORRECTION DU VIRAGE DE LA PHTALÉINE A CAUSE DE LA PRÉSENCE DE SELS AMMONIACAUX.

Lorsqu'on neutralise une solution acide en présence de phtaléine, dans un milieu contenant des sels ammoniacaux, on est amené à verser une quantité de soude supérieure à la quantité nécessaire, il y a retard du virage, et l'on a l'habitude d'utiliser, pour remédier à cette erreur, un terme correctif qui d'ailleurs varie avec les auteurs.

Or, notre méthode comporte un dosage alcalimétrique par différence avant et après calcination, la première détermination ayant lieu en présence des sels ammoniacaux et la deuxième en leur absence. Pour éviter toute correction, il nous a semblé que le plus simple serait d'introduire, au moment du titrage dans la deuxième détermination, une quantité de sels

(1) Il ne semble pas que cette action de la soude provoque, en quantité bien notable, la formation de phosphate ammoniaco-magnésien, comme il ressort des observations qui nous ont été obligeamment communiquées par M. Chatron.

ammoniacaux à peu près semblable à celle qui existait dans la première.

III. — Justification de la technique.

Une question préalable s'est posée au début de la mise au point de notre méthode, question soulevée par les observations de P. Fleury et P. Ambert [7] montrant que, par incinération d'un milieu neutre contenant des chlorures et des matières organiques, il y avait libération d'une quantité d'alcali variable avec les composés organiques présents. Mais en réalité cette libération n'est très nette que lorsqu'on opère en présence d'un poids de NaCl de l'ordre de 0 gr. 30 à 0 gr. 40. Or, dans le cas de l'incinération de 10 centimètres cubes d'urine, cette quantité n'est plus que d'environ 0 gr. 05 à 0 gr. 10.

De plus, notre méthode opère en présence d'un excès d'alcali, or, on a montré [4] que la disparition de chlore corrélative de l'apparition de l'alcalinité est annihilée lorsqu'on opère l'incinération en milieu alcalin. Nous pouvons donc considérer dans notre cas, cette cause d'erreur comme négligeable.

Cette objection écartée, nous avons d'abord vérifié en utilisant des solutions contenant à côté d'acétate de soude soit du phosphate disodique soit du sulfate d'ammonium que, tout calcul fait, on retrouvait bien en opérant l'incinération en présence d'une quantité connue de soude titrée en excès, la quan-

tité de soude correspondant à la transformation de l'acétate de soude en carbonate de sodium.

ESSAI DE DOSAGE SUR DES SOLUTIONS DE COMPOSITION ANALOGUE A CELLE DE L'URINE.

Ces expériences préliminaires ayant justifié nos prévisions, nous avons constitué un milieu qui, du point de vue qui nous préoccupait, correspondait au milieu urinaire, en nous inspirant de la solution utilisée par Chatron [1] pour justifier sa technique de détermination du bilan acido-basique urinaire. En réalité la concentration de cette solution est le double de celle de Chatron pour nous permettre l'addition d'autres produits dont nous voulions examiner l'influence. Naturellement nous tenons compte de cette particularité dans nos essais et nos calculs.

Solution A.

Chlorure de sodium pur.....	10 g.
Sulfate d'ammonium pur.....	2 g.
Solution d'acide lactique.....	(1 cm ³ = 1,005 Sol. N) 25 cm ³
Solution d'acide acétique.....	(1 cm ³ = 1,035 Sol. N) 25 cm ³
PO ⁴ Na ² H, 12 H ² O.....	9,05
Eau q. s. p.....	500 cm ³

En ajoutant à une telle solution son volume d'eau, on obtient un liquide dont la composition quantitative est voisine de celle d'une urine moyenne.

Les acides organiques contenus dans 10 centimètres cubes de cette dilution (= 5 centimètres cubes de solution A) correspondent à 5,11 cm³ de sol. déci-normale.

1^{er} Essai. — Dans une fiole de 125, on mesure successivement :

Solution A	25 cm ³
Eau	25 cm ³
Sol. N/10 de soude q. s. p.	125 cm ³

On prélève d'une part 25 centimètres cubes pour un dosage d'acidité totale AT (acidité libre AL + acidité au formol AF) après addition de 15 centimètres cubes de $\text{SO}^4 \text{H}^2 \text{N}/10$ et d'autre part 25 centimètres cubes qu'on incinère et que l'on titre après redissolution dans 15 centimètres cubes de $\text{SO}^4 \text{H}^2 \text{N}/10$ selon la technique précisée plus haut — ce qui donne $\text{N} - \text{N}' = 2,8 \text{ cm}^3$ à $2,9 \text{ cm}^3$, moyenne $2,85 \text{ cm}^3$.

On trouve ainsi en centimètres cubes :

$$\begin{array}{rcl} \text{AT} & = & 8,10 \\ \text{N}' & = & 2,85 \\ \hline & & \text{théorie } 5,11 \end{array}$$

La différence est : $\text{AO} = 5,25$

ADDITION DE CALCIUM ET DE MAGNÉSIUM.

2^e *Essai*. — On opère en présence de chaux et de magnésie à une concentration voisine de la concentration urinaire moyenne (soit par litre 0 gr. 22 CaO et 0 gr. 40 MgO).

Dans une fiole jaugée à 200 centimètres cubes on introduit :

Sol. A	50 cm ³
Chlorure de calcium (6 H ² O)	0 g. 085

Solution B.

Chlorure de magnésium (6 H ² O)	0 g. 200
Eau q. s. p.	100 cm ³

On utilise cette solution pour un dosage selon la technique décrite :

Solution B	50 cm ³
Solution N/10 de soude q. s. pour....	125 cm ³

Filtrer et prélever comme ci-dessus.

On obtient ainsi pour l'acidité totale AT 9,90 et 10,0 et pour N' 4,80.

On a donc en centimètres cubes :

$$\begin{array}{rcl} \text{AT} & = & 9,95 \\ \text{N}' & = & 4,80 \\ \hline \text{AO} & = & 5,11 \end{array} \qquad \text{théorie } 5,11$$

ADDITION D'URÉE ET DE GLUCOSE.

3^e *Essai*. — Dans ces essais nous avons ajouté au milieu, en plus du magnésium et du calcium, une certaine quantité d'urée à la concentration finale de 20 p. 1000 et du glucose à la concentration finale de 5 p. 1000 pour figurer les matières organiques.

La valeur de N' déterminée dans les conditions des essais précédents a été 4,75 et 4,75, valeur très voisine de celle du 2^e essai. Donc la présence de ces corps ne provoque pas de perturbation lors de l'incinération.

Mais nous avons eu l'occasion de constater une cause d'erreur possible attribuable au glucose, c'est la formation spontanée de composés acides sous l'influence de la soude, en quantité suffisante pour troubler les résultats, dans le cas où on laisse la solution sucrée en contact avec la soude pendant 24 heures.

Si le titrage est immédiat, il ne semble pas qu'il y ait à redouter cette erreur.

Remarque. — On remarquera que, dans notre technique, la valeur de l'acidité totale (AT) obtenue lorsque le milieu contient du magnésium et du calcium, est supérieure (9,95) à celle qu'on observe en l'absence de ces éléments (8,10). Le mécanisme de ce changement a été expliqué plus haut (formation d'un phosphate tricalcique ou trimagnésien à partir d'un phosphate dialcalin, d'où « blocage » du troisième oxhydryle de l'acide phosphorique). Nous avons d'ailleurs vérifié que cette augmentation portait exclusivement sur l'acidité libre AL (acidité titrable à la phtaléine) et non sur l'acidité AF titrable en présence de formol, il n'y a donc pas pratiquement de fixation d'ammoniaque par le précipité.

IV. — Résultats obtenus avec notre technique appliquée à l'urine.

a) COMPARAISON AVEC CEUX DONNÉS PAR LA MÉTHODE DE VAN SLYKE ET PALMER.

Nous avons été amené à comparer les résultats obtenus, sur une même urine *non déféquée*, d'une part par notre méthode, de l'autre par la méthode de Van Slyke et Palmer en corrigeant chaque résultat d'après sa teneur en acide phosphorique :

(En cm ³ de solution N/10 pour 25 cm ³ de prise d'essai)		
Méthode par colorimétrie (sans défécation)	Méthode par calcination	Différence
12,8	6,92	5,88
19,35	13,4	5,95
15,7	9,85	5,85
20,6	9,75	10,85
19,6	17,3	2,3
14,5	11,2	3,3
13,1	9,05	4,05
15,1	9,5	5,6
15	8,4	6,6
17,65	12,45	5,2
12,8	9,1	3,7
14,4	10,3	4,1
18,7	14,6	4,1
17,7	10,6	7,1
16	11,5	4,5
14,3	8,1	6,2
17,1	11	6,1
21,75	15,5	6,25
12,85	9,75	3,1
10	9	1,0
16,9	15,5	1,4
21,3	19	2,3
18	14,15	3,85
12,8	7,3	5,5
14,2	11,1	3,1
13,5	9,5	4,0
17,75	9,7	8,05
15,15	7,2	7,95
16,9	6,5	10,4
13,2	6,8	7,2
23	11,4	8,6
20	17	3
13,6	10,4	3,2
16,8	13,8	3,0
13,6	10,4	3,2

b) COMPARAISON, APRÈS CORRECTIONS, DES DOSAGES
DONNÉS PAR LA MÉTHODE DE VAN SLYKE ET PAL-
MER.

On voit que les chiffres obtenus par la méthode de Van Slyke et Palmer sont toujours supérieurs à ceux obtenus par notre méthode par calcination. Et on sait que dans la méthode américaine on englobe dans une même détermination aussi bien les bases faibles que les acides faibles. Il semble alors intéressant de dresser un bilan des diverses bases faibles qu'il est possible de doser dans l'urine et de défalquer du résultat brut donné par la méthode américaine la somme des bases ainsi dosées, pour comparer la valeur ainsi rectifiée aux résultats donnés par notre méthode.

Les bases faibles que nous avons dosées sont l'ammoniaque, les amino-acides, la créatinine et la créatine.

Nous avons alors exprimé nos résultats en centimètres cubes de solution alcaline décinormale en utilisant les coefficients indiqués par Van Slyke et Palmer dans leur mémoire pour l'ammoniaque et les amino-acides et la créatinine, et celui que nous avons établi pour la créatine. On trouvera dans le tableau ci-joint le résumé de nos dosages sur 7 urines :

	Van Slyke Brut	Correction due à					Van Slyke corrigé	Acide organique par incinération
		NH ³	Acides aminés	Créatinine	Créatine	P ² O ⁵		
Urine n° 1	21,4	1,30	1,40	1,80	0,25	3,40	13,35	11,30
Urine n° 2	28,7	0,80	1,60	3,55	0,40	6,90	14,90	14,0
Urine n° 3	20,5	0,65	1,30	2,30	0,30	5,45	10,60	10,60
Urine n° 4	17,5	0,43	1,40	2,03	0,30	4,60	8,70	8,60
Urine n° 5	15,1	0,46	1,20	1,77	0,20	2,80	10,67	7,6
Urine n° 6	16,5	0,50	1,60	1,04	0,15	4,00	9,40	9,8
Urine n° 7	20,3	0,66	1,40	2,32	0,20	5,20	10,50	9,0

Ce tableau montre que d'une façon générale les résultats obtenus *après correction* par la méthode américaine se rapprochent très sensiblement de ceux donnés par notre méthode. Sur les 7 cas étudiés deux (urine 5 et 1) seulement sont nettement différents ; mais sur ces deux cas, un seul (urine 5) présente un écart très notable.

Comme notre méthode est spécifique des acides organiques, il nous semble légitime de conclure de ces coïncidences que, pratiquement la méthode de Van Slyke, corrigée par défalcation des valeurs revenant à l'azote amino-ammoniacal et au groupe créatinine et créatine, donne d'ordinaire des résultats qu'on doit attribuer presque exclusivement aux acides organiques. C'est seulement dans quelques cas que

l'on voit apparaître des différences notables. On est amené ainsi à attribuer ces différences à des corps basiques inconnus dont l'étude présente peut-être un certain intérêt.

V. — Résumé et Conclusions.

Nous avons mis au point une technique qui permet d'utiliser pour la détermination des acides organiques urinaires, la méthode classique de Hehner.

Après avoir justifié les divers temps de cette technique nous montrons que le plus souvent, les résultats obtenus par la méthode de Van Slyke et Palmer coïncident d'une façon satisfaisante avec ceux donnés par la nôtre, à condition de défalquer, des résultats de la méthode américaine, la part qui revient à l'azote amino-ammoniacal et au groupe de la créatine et de la créatine.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DE LA MÉTHODE DE LAFARGUE

COMPARAISON AVEC LA MÉTHODE DE HEHNER

I. — Méthode de Lafargue.

a) DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

M. Lafargue [13-14] a mis au point une méthode de dosage des acides organiques urinaires après extraction éthérée.

Il reprend une méthode déjà utilisée par Desgrez et Polonowski [5], par WIDMARK [23], et basée sur les faits suivants : l'acide urique et les acides oxyprotéiques de Dombrowsky mis à part, tous les acides organiques normaux sont plus ou moins solubles dans l'éther et entraînés après libération par acidification suffisante (les acides forts sont insolubles dans l'éther).

Il se sert d'un appareil déjà utilisé par Clausen, [2] (fig. 1), appareil en verre de petite dimension, relativement facile à construire. Il en donne les dimensions exactes : on prend un ballon de Kjeldahl de 200 centimètres cubes possédant un col très long, de 25 centimètres environ, qui va servir d'enveloppe à l'appareil extracteur ; celui-ci est constitué d'abord, par un tube T de 14 à 15 centimètres de longueur et de 8 millimètres de diamètre qui porte à sa partie supérieure un bec permettant à l'éther de s'échapper plus facilement ; et, deuxièmement, par un tube très étroit de 25 centimètres de longueur environ, perforé à la base, d'un petit trou de 1 millimètre de diamètre ; la partie supérieure s'évase en entonnoir ; le point le plus important est la largeur extérieure de ce tube, il doit avoir un diamètre tel que, quand on en bouche la partie évasée avec le doigt et qu'on l'introduit dans le tube T contenant 2,7 cm³ de liquide, il en amène le niveau à une hauteur de 10 à 11 centimètres environ, voir fig. page 84.

L'appareil est maintenu dans le ballon de Kjeldahl à l'aide d'un fil passé autour du tube extérieur sous le bec et coincé dans le bouchon qui va fermer le ballon et le relier au réfrigérant. On part de 2 centimètres cubes d'urine auxquels on ajoute 1 gr. 20 de sulfate d'ammoniaque destiné à empêcher l'hydrolyse pendant l'opération, puis 6 gouttes d'acide sulfurique pur pour libérer les acides organiques salifiés ; l'extraction est faite avec 40 centimètres cubes d'éther exempt d'alcool (traité par le sodium).

L'appareil est mis au bain-marie à 70° à 80°. L'éther placé dans le ballon se volatilise ; condensé, il retombe dans l'entonnoir du long tube intérieur, en ressort à la partie inférieure et remonte en traversant la couche d'urine de 10 centimètres cubes de hauteur, le trop plein s'échappe par le bec et retombe dans le ballon et le cycle est fermé. Il faut que la partie inférieure de l'appareil extracteur soit à une distance suffisante de l'éther en ébullition pour que celui qui retombe condensé ne soit pas lui-même porté à une température trop élevée ; s'il vient à bouillir, il y a débordement et entraînement du liquide aqueux, qui par sa très grande acidité viendra fausser le dosage des acides organiques.

M. Lafargue pense qu'une opération d'une heure 1/2 est suffisante pour avoir une extraction totale. Après ce temps on procède au dosage des acides entraînés par l'éther. Celui-ci est recueilli et le ballon rincé à l'éther ; l'éther est introduit dans un tube de Nessler de 70 centimètres cubes portant un trait de jauge à 20 centimètres cubes. On ajoute 8 à 10 centimètres cubes d'eau, 1 centimètre cube de rouge de crésol (1), puis un léger excès de soude N/50, ce que l'on constate au virage rouge violacé de l'indicateur. Il est nécessaire de mettre un excès de soude pour que les acides ne se partagent pas entre l'eau et l'éther surnageant ; on revient en arrière avec une solution

- (1) rouge de crésol, 0,02 g.
alcool à 90°, 54 centimètres cubes.
eau, 46 centimètres cubes.
soude, q. s. p. obtenir la couleur orangée.

Louise Caron-Claeyssen.

d'acide sulfurique au centième normale. On amène la liqueur aqueuse sous un volume de 20 centimètres cubes à une teinte jaune orangé que l'on compare à celle d'un témoin préparé à pH 8,2. Ce témoin est préparé de la façon suivante :

acide borique M/5	5 cm ³
ClK M/5	5 cm ³
NaOH N/10	1,18 cm ³
rouge de crésol	1 cm ³
eau bidistillée	20 cm ³

2 gouttes de toluène pour la conservation. D'ailleurs le virage nous a paru suffisamment brusque pour qu'on puisse se passer d'un témoin, le passage du violet au jaune-rosé servant à marquer la fin de la réaction.

Il est nécessaire de faire une opération témoin avec une solution de :

urée	20 g.
ClNa	10 g.
PO ⁴ Na ³ H.....	5 g.
eau q. s. p.....	1000 cm ³ .

car il y a une petite quantité de soude absorbée dans ces conditions, la correction à faire est de 0,30 cm³.

Si nous sommes parti de 5 centimètres cubes de soude N/50, la valeur des acides organiques est exprimée par la formule suivante :

$$(5 - \frac{x(\text{SO}^4\text{H}^2)}{2} + t) \times 100$$

x est le nombre de centimètres cubes d'acide sulfurique au centième normal trouvé et t la valeur du témoin.

b) MODIFICATION DE L'APPAREIL DE LAFARGUE.

Nous avons essayé de pratiquer cette extraction en grand sur l'appareil de Fayolle et Lormand [6]. L'addition de sulfate d'ammoniaque augmente beaucoup la densité du liquide et ceci nécessite que les appareils aient une grande hauteur. La marche de l'opération est très lente. L'extraction se fait suivant une courbe d'abord presque verticale, puis redescend et tend peu à peu vers une ligne horizontale que l'on peut considérer comme une constante propre aux quantités mises en œuvre. L'opération étant très lente, on peut admettre qu'il se reforme constamment une petite quantité d'acide, ce qui explique que l'épuisement ne paraisse pas complet. La lenteur de l'extraction (6 à 8 heures et jusqu'à 30 heures et plus) nous a forcé à utiliser la méthode micrométrique de Lafargue. L'appareil présente quelques petits inconvénients : l'éther n'arrive à la partie inférieure du liquide à épuiser que par un ou deux petits trous et monte directement à la partie supérieure en bulles assez grosses, de sorte que si l'opération marche trop vite l'éther peut sortir en entraînant des traces d'acide sulfurique et le dosage est à recommencer.

Contrairement à M. Lafargue, nous avons rarement obtenu une extraction complète en une heure $1/2$ et nous avons presque toujours opéré en 3 ou 4 heures ; dans ces conditions la correction à faire est plus élevée, elle est de $0,5 \text{ cm}^3$ à $0,6 \text{ cm}^3$. D'ailleurs quand

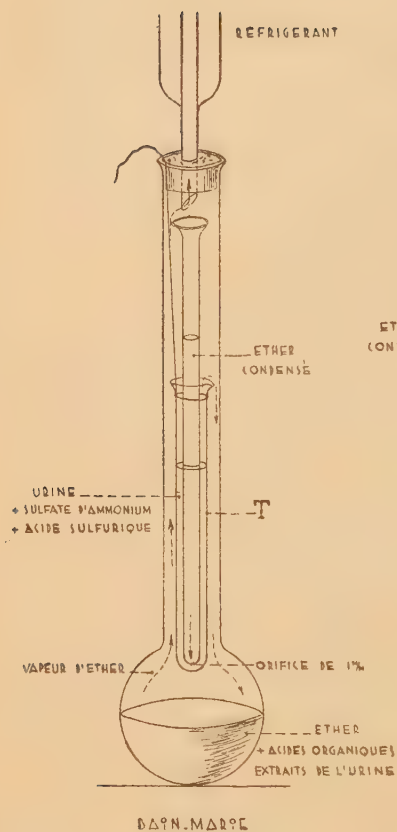


fig. 1

APPAREIL DE LAFARGUE

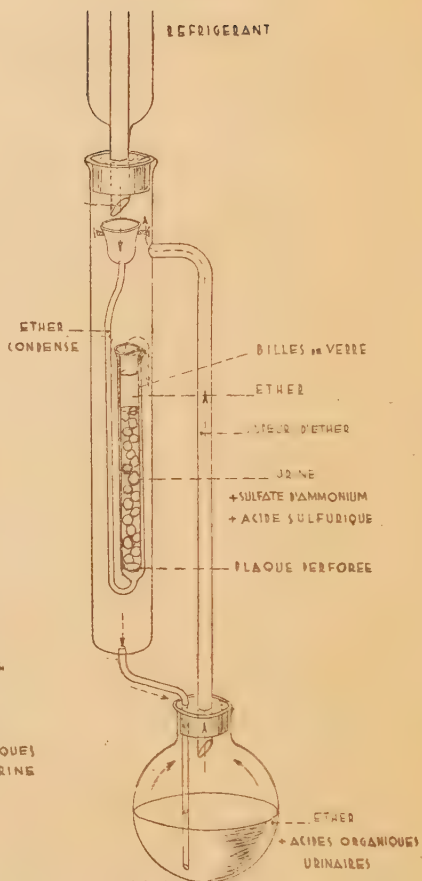


fig. 2

APPAREIL QUE NOUS AVONS UTILISÉ

on fait une seconde opération pour vérifier la fin de l'épuisement, on trouve généralement un chiffre de cet ordre, et qui reste à peu près le même si on recommence une troisième fois.

Nous avons imaginé de modifier un peu l'appareil de Lafargue, nous inspirant de celui de Fayolle et Lormand, mais en construisant l'appareil en deux parties, ce qui permet un nettoyage plus facile ; la construction en est suffisamment simple pour qu'on puisse le fabriquer soi-même (fig. 2).

Il comprend d'abord un récipient semblable au ballon de Kjeldahl à long col de l'appareil de M. Lafargue, possédant à la partie supérieure trois petites pointes intérieures destinées à maintenir l'appareil extracteur placé à l'intérieur ; celui-ci est formé par un tube s'évasant à la partie supérieure en un entonnoir, reposant sur les pointes du col du ballon, et destiné à recevoir l'éther condensé par le réfrigérant. La hauteur totale de l'appareil est de 20 à 25 centimètres (calculée pour avoir une colonne d'éther suffisante pour équilibrer celle du liquide à épuiser). Ce tube se recourbe pour revenir sur lui-même verticalement et se terminer par une partie plus large, de 1 centimètre de diamètre intérieur environ, et de 12 à 14 centimètres de hauteur, munie d'un léger bec extérieur en haut pour l'évacuation de l'éther, la partie descendante présente une légère déviation qui n'est destinée qu'à diminuer l'encombrement de l'appareil. Nous aurions désiré placer à l'endroit où le tube remonte et devient plus large une

petite plaque très poreuse qui divise très finement l'éther ; à défaut de cette plaque nous avons dû nous contenter d'un tampon d'amiante peu tassé et dans l'appareil construit par un fabricant, d'une plaque de verre perforée de trous très petits de un cinquième de millimètre. Le liquide à épuiser, ici 2 centimètres cubes d'urine, ayant dissous 1,2 de $\text{SO}^4 (\text{NH}^4)^2$ et VI gouttes d'acide sulfurique, est placé au-dessus de cette plaque perforée et la hauteur est amenée à 6 à 7 centimètres par l'introduction de perles de verre, laissant au-dessus un intervalle qui sera occupé par l'éther après son passage sinueux à travers le liquide.

Cependant, comme dans l'appareil de M. Lafargue, si la marche est trop rapide, si la température devient trop élevée, on s'expose à voir bouillir l'éther qui passe à travers l'urine, amenant les graves perturbations que nous avons signalées. Il n'y avait qu'un moyen d'y remédier, c'était de placer latéralement le réservoir contenant l'éther, de cette façon la partie où se trouve l'appareil extracteur est en dehors du bain-marie. Cette complication apportée à l'enveloppe n'entraîne pas de grandes difficultés de fabrication (pour nos premiers essais nous avons utilisé à cet usage une enveloppe de réfrigérant débarrassée de la partie centrale, un seul raccord a été nécessaire). L'appareil ainsi construit est légèrement plus compliqué, mais on peut pousser la marche de l'opération presque autant qu'on le désire sans aucun risque. Il nous semble que cet appareil doive assurer

les meilleures conditions d'extraction des acides solubles dans l'éther puisque la bulle d'éther arrive divisée au sein du liquide et parcourt ensuite un chemin sinueux ; on peut pousser l'opération à la vitesse que l'on désire sans inconvénient, par conséquent, le plus rapidement possible. Une opération de deux heures nous a paru suffisante.

II. Comparaison des résultats obtenus par la méthode de Lafargue avec ceux obtenus par la méthode de Hehner.

Ayant mis au point cette méthode de dosage des acides organiques, nous l'avons pratiquée en même temps que la méthode de Hehner, laquelle peut être pratiquée sur 2 centimètres cubes sans inconvénient. Les résultats fournis montrent que constamment les chiffres donnés par le dosage par calcination sont supérieurs à ceux du dosage après extraction éthérée : voir le tableau de la page 88.

Il aurait été très intéressant de faire une vérification directe en pratiquant une calcination sur le résidu de l'extraction éthérée. Il fallait d'abord remplacer le sulfate d'ammoniaque qui aurait entraîné l'addition de quantités considérables de soude, nous lui avons substitué le sulfate de sodium ; il ne semble pas que celui-ci ait amené des perturbations dans l'extraction éthérée et le dosage des acides ; mais quand nous avons essayé de faire un dosage de Hehner sur le résidu, nous avons eu des chiffres toujours

assez élevés alors même que nous aurions dû ne rien trouver. En effet, une solution de sulfate de sodium traitée par calcination puis dosée acidimétriquement, nous a fourni des chiffres loin d'être négligeables. Cette vérification directe était donc impossible.

Dosages effectués sur 10 centimètres cubes d'urine, exprimés en centimètres cubes de solution acide décimale.

Méthode de Hehner	Méthode de Lafargue	Macrométhode
11,4	7,05	6,15
8,4	6,25	
11,7	7,2	
10,75	7,05	
12	8,05	
7,1	4,8	
9,7	5,6	
8,55	7,5	
7,80	6,05	
9,1	8,9	
6,3	5,2	
5,3	3,1	
12,8	7,9	
8,5	6,4	
38,2 et 40 (1)	37,6 et 41	

(1) ce dernier essai a été fait sur une urine contenant 18,6 g. de glucose, 2,128 g. d'acétone et 9 grammes d'acide 3 oxybutyrique ; c'est la seule fois où le résultat du dosage par la méthode de Lafargue ait atteint la même valeur que celle de Hehner).

Nous voyons donc que la méthode par extraction étherée donne toujours des chiffres inférieurs à celle par calcination. L'acide urique n'est pas entraîné par l'éther, il n'est donc pas estimé dans la méthode de

Lafargue, alors qu'il est dosé dans celle de Hehner ; mais nous avons vu, à propos d'autres évaluations, que l'erreur acidimétrique probable calculée à partir de la teneur moyenne en acide urique de l'urine est faible, et ne suffit pas à combler l'écart des résultats trouvés dans les deux méthodes. Il faut donc admettre qu'une certaine fraction, d'importance variable, serait insoluble dans l'éther.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans ce travail nous avons étudié différentes méthodes de dosages des acides organiques urinaires, très différentes les unes des autres dans leur principe, les unes utilisant le virage de certains colorants à des valeurs déterminées de la concentration en ion hydrogène, d'autres la transformation en carbonates des acides organiques, à l'exclusion des acides minéraux, enfin la dernière, la solubilité de ces acides organiques dans l'éther.

Nous avons fait précéder l'étude de la méthode colorimétrique de celle des colorants permettant d'obtenir un virage à un pH aussi faible que 2,7; nous avons vu que l'orangé IV pouvait convenir à presque tous les cas et que, lorsque il était inutilisable par suite de sa précipitation ou de sa décoloration, nous pouvions le remplacer sans inconvénient par le bleu de para-xylénol; à défaut de ce colorant qui est assez coûteux, le bleu de bromo-phénol, amené à un pH un peu plus élevé, peut encore rendre les mêmes services, en sachant que les chiffres fournis sont légèrement plus faibles.

Ceci nous a permis d'aborder la question des subs-

tances utilisables pour entraîner les phosphates et les carbonates. Il semble que toutes entraînent non seulement les phosphates, mais d'autres corps susceptibles d'intervenir dans le dosage acidimétrique. L'emploi de la baryte paraît peu indiqué ; celui de la magnésie semble plus intéressant, mais il est d'un maniement plus délicat. Il reste donc la chaux qui présente au moins cet avantage d'être très facile à utiliser et ne demande aucune correction de volume. Cependant il paraît plus simple de partir de l'urine sans aucun traitement, ceci ne nécessite qu'un dosage supplémentaire des phosphates, suivi d'une correction. Dans ce dernier cas on trouve la valeur des acides organiques un peu plus élevée. Nous savons que la méthode colorimétrique dose certains corps tels que la créatinine et la créatine et les acides aminés, plus une faible portion de l'ammoniaque ; mais parmi ceux-ci c'est la créatinine qui joue le rôle le plus important. Nous avons ensuite adapté au cas de l'urine la méthode de Hehner, utilisée par Seemann pour doser les acides organiques du suc gastrique. Il nous a fallu tenir compte de la présence de corps capables d'amener des perturbations, telles que les phosphates, les sels de calcium, les sels ammoniacaux. Nous sommes arrivés à établir une méthode écartant ces différents obstacles et cependant d'une mise en œuvre assez simple. Une difficulté d'ordre technique subsiste, c'est l'obligation de se servir pour l'incinération d'une capsule de platine. La comparaison avec la méthode colo-

rimétrique semble montrer que si l'on fait de part et d'autre les corrections nécessaires, on arrive, dans une grande partie des cas, sensiblement aux mêmes résultats ; on peut donc admettre que les résultats de la méthode de Van Slyke et Palmer, si on a soin de leur faire subir les corrections rappelées plus haut, donnent bien la teneur réelle de l'urine en acidité organique, sauf dans quelques cas exceptionnels, dont l'étude présenterait probablement un certain intérêt.

Enfin, nous avons fait la comparaison avec la méthode par l'épuisement à l'éther, mise au point par Lafargue, et nous avons constaté que les chiffres fournis par cette méthode étaient toujours plus bas que ceux donnés par la méthode de Hehner ; cette constatation tend à faire admettre que dans le bloc des acides organiques une certaine fraction n'est pas soluble dans l'éther.

VU : *le Doyen,*

VU : *le Président de la thèse,*

GUÉRIN

HERISSEY

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

ROUSSY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. CHATRON (M.). — Bilan acido-basique urinaire (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 783-789).
2. CLAUSEN (S. W.). — A method for determination of small amounts of lactic acid (*Journ. of biol. chem.*, 1932, **52**, 263 cité par LAFARGUE, *Thèse doct. Univ. Pharm. Bordeaux*, 1932).
3. DANET (R.). — Transformation en microméthode du procédé Ronchèse pour le dosage de l'acide urique urinaire (*Journ. pharm. et chim.*, 1927, **6**, 405).
4. DAVIS (H. E.). — The decomposition of chloride by ignition with organic matter (*Journ. of Soc. chem. ind.*, 1901, **20**, 98, cité par P. FLEURY et P. AMBERT, *loc. cit.*).
5. DESGREZ et POLONOWSKI. — Détermination globale des acides organiques non aminés de l'urine (*C. R. Ac. Sc.*, 1920, **170**, 1008, cité par Lafargue *loc. cit.*).
6. FAYOLLE et LORMAND. — Appareil pour extraction continue au moyen des solvants non miscibles (*Chimie et industrie*, 1922, **8**, 273).
7. FLEURY (P.) et AMBERT (P.). — L'alcalinisation des cendres au dépens des chlorures alcalins, cause d'erreur dans le dosage des acides organiques par la méthode de HEHNER (*Journ. pharm. et chim.*, 1928, **8**, 5).
8. GOIFFON (R.) et NEPVEU (F.). — La titration des acides organiques dans l'urine (*C. R. Soc. biol.*, 1922, **86**, 1132).
9. GREENWALD (M. I.). — L'élimination d'« acide organique » dans la pneumonie, méthode de dosage (*Journ. of biol. chem.*, 1930, **85**, 447 d'après *Journ. pharm. et chim.*, 1931, **13**, 407).
10. GRIMBERT (L.) et MOREL. — Détermination de l'acidité urinaire (*Journ. pharm. et chim.*, 1912 [7], **5**, 289 et 337).
11. GUILLAUMIN (Ch. O.). — Sur un chromoscope destiné à la mesure de la concentration en ion H des liquides par les indicateurs colorants (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1923, **5**, p. 153 et *pharm. Journ. et chim.*, 1922 [7], **26**, 452).

12. GUILLAUMIN (Ch.-O.). — Considération sur l'acidité urinaire mesurée à l'aide des méthodes physico-chimiques (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1924, **6**, 14).
13. LAFARGUE (M.). — Recherches biochimiques sur les acides organiques de l'urine humaine (*Thèse Doct. Univ. Pharm. Bordeaux*, 1932).
14. LAFARGUE (M.). — Microdosage des acides organiques de l'urine par extraction à l'éther (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 703 et *C. R. Soc. biol.*, 1931, **107**, 1286).
15. MACHEBŒUF (M. A.). — Méthode permettant le dosage exact du phosphore dans de petites quantités de sang (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, 464).
16. MAINZER (F.) et JOFFE (A.). — Die Bestimmung der organischen Säuren in kleinen Harnmengen (*Biochem. Zeitschr.*, 1929, **207**, 167, cité par M. LAFARGUE, *loc. cit.*).
17. MYERS (V.). — *Practical chemical analysis of blood*, p. 65. H. Kimpton, ed., London, 1924.
18. PALMER (W. W.). — The titration of organic acids in urine (*Journ. of biol. chem.*, 1926, **68**, 245).
19. PHILIBERT (M. J.). — L'urée, l'ammoniaque et les amino-acides urinaires au point de vue analytique (*Thèse Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1920).
20. PHILIBERT (M. J.). — Dosage exact de l'urée, de l'ammoniaque et des amino-acides urinaires après précipitation de l'ammoniaque (*Journ. pharm. et chim.*, 1921 [7], **24**, 5 et 10).
21. SEEMANN. — Über das Vorhandensein freier Salzsäure im Magen (*Zeitschr. für klinische Medizin.*, 1882, **5**, 272 d'après P. FLEURY et P. AMBERT, *loc. cit.*).
22. VAN SLYKE (D. D.) et PALMER (W.). — The titration of organic acids in urine (*Journ. of biol. chem.*, 1920, **41**, 567).
23. WIDMARK (E. M. P.). — Über die Bestimmung ätherlöslicher Säuren im Harnmittels Schaukelextraktion (*Biochem. Zeitschr.*, 1929, **215**, 434, cité par LAFARGUE, *loc. cit.*).
24. WIDMARK (E. M. P.) et EWERT LJUNBERG. — Une cause d'erreur dans le dosage des acides organiques de l'urine, d'après VAN SLYKE et PALMER (*Biochem. Zeitschr.*, 1929, **216**, p. 1 à 3 d'après le *Journ. pharm. et chim.*, 1932, **15**, 464).

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
--------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DE LA MÉTHODE DE VAN SLYKE ET PALMER

CHAPITRE I. — EXPOSÉ DE LA MÉTHODE.....	7
Considération théorique	7
Technique de Van Slyke et Palmer.....	9
Modification apportée à cette 1 ^{re} méthode.....	11
Technique utilisée.....	12
CHAPITRE II. — ÉTUDE DE QUELQUES INDICATEURS COLORÉS....	15
<i>Inconvénients de l'orangé IV</i>	15
1) β dinitro-phénol.....	16
2) bleu de bromo-phénol.....	16
3) bleu de para-xylénol.....	19
CHAPITRE III. — DE QUELQUES MODES DE DÉFÉCATION DE L'URINE	22
1) <i>Baryte</i>	22
a) Technique	22
b) Comparaison entre les résultats trouvés avec l'urine traîtée par la chaux et par la baryte	24
c) Rôle du sulfate de sodium.....	24
2) <i>Magnésie</i>	27
a) Méthode de Philibert.....	27
b) Difficultés de l'emploi de l'orangé IV, essai d'y remé- dier	28
3) <i>Suppression de la défécation basique</i>	32
a) Comparaison entre les résultats trouvés sans déféca- tion et après usage de la chaux.....	36
Louise Caron-Claeysen.....	7

CHAPITRE IV. — INFLUENCE DE LA DÉFÉCATION BASIQUE SUR L'ACIDE URIQUE.....	38
a) Rôle de l'acide urique dans le dosage acidimétrique..	39
b) Technique du dosage de l'acide urique.....	39
c) Tableau des dosages de l'acide urique urinaire après traitement par la chaux, la baryte et sans défécation.	40
d) Étude de l'entraînement de l'acide urique en fonction du temps de contact avec les bases.....	42
e) Erreur par défaut due à l'entraînement de l'acide urique	43
CHAPITRE V. — INFLUENCE DE LA DÉFÉCATION BASIQUE SUR LA CRÉATININE ET LA CRÉATINE.....	46
a) Rôle joué par ces deux bases dans le dosage acidimétrique.....	46
b) Action de la chaux.....	48
c) Étude du dosage de la créatinine	50
Influence de la dilution du liquide à doser et du temps de contact avec l'acide picrique	50
d) Étude du dosage de la créatine.....	52
e) Variations acidimétriques entraînées par les modifications subies par ces deux bases.....	53
CHAPITRE VI. — CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE.....	56

DEUXIÈME PARTIE

APPLICATION DE LA MÉTHODE DE HEHNER AU DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES URINAIRES

CHAPITRE I. — MÉTHODE DE HEHNER.....	59
I. a) <i>Technique</i>	60
b) <i>Calcul</i>	63
II. <i>Explication de la technique</i>	65
a) Rôle des phosphates	65
b) Rôle de l'ammoniaque.....	66
c) Intervention du calcium et du magnésium.....	66
d) Correction du virage de la phtaléine due à la présence des sels ammoniacaux.....	69
III. <i>Justification de la technique</i>	70

Expériences faites sur des solutions de composition voisine de celle de l'urine.....	71
Addition de calcium.....	72
Addition de glucose.....	73
IV. a) <i>Comparaison des résultats obtenus par cette méthode avec ceux trouvés par la méthode de Van Slyke et Palmer</i>	74
b) après correction dues à la présence de l'azote amino-ammoniacal.....	76
V. Résumé et conclusion.....	78

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DE LA MÉTHODE DE LAFARGUE

CHAPITRE I.

I. a) Description de l'appareil utilisé par Lafargue....	79
Description de la méthode	79
b) Modifications apportées à l'appareil de Lafargue..	83
Schéma des appareils.....	84
II. a) Comparaison des résultats obtenus par la méthode de Lafargue avec ceux obtenus par la méthode de Hehner modifiée.....	87
III. Conclusion	88
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	91
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.....	95

SAINT-AMAND (CHER), FRANCE. — IMPRIMERIE BUSSIÈRE. — 17-11-1937.
